ISSN 2146-7447

T.C.
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
İZMİR / BORNOVA VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

BORNOVA VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

THE JOURNAL OF BORNOVA VETERINARY SCIENCE

CİLT/Volume: 34 SAYI/Number: 48 YIL/Year: 2012

Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nün bilimsel yayın organı olup, yılda bir kez yayınlanır. Derginin kısaltılmış adı Bornova Vet. Bil. Derg.'dir.

The Journal of Bornova Veterinary Science is the scientific publication of Izmir/Bornova Veterinary Control Institute Directorate, which is published once a year. The designation of the journal is J. Bornova Vet. Sci.

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Adına Sahibi

Necdet AKKOCA
Enstitü Müdürü

Yayın Kurulu/Editorial Board
Dr. Öznur YAZICIOĞLU
Dr. M. Ziynet GÜNEN
Dr. M. Melih SELVER

Bu sayıda görev alan Yayın Danışmanları
(Board of Scientific Reviewers of this issue)

Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Prof. Dr. Sezai KAYA
Prof. Dr. Sibel YAVRU

*İsimler soyadına göre alfabetik sırayla yazılmıştır.

Yazışma Adresi
(Correspondance Address)
İzmir/ Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Erzene Mah. Ankara Cad. No. 172-155
35040 Bornova / İZMİR
Tel: 0 (232) 388 00 10
Fax: 0 (232) 388 50 52
E-posta: bornova@bornovavet.gov.tr
dergi@bornovavet.gov.tr
Web site: http://bornovavet.gov.tr
Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli

Bu dergi, 1999 yılına kadar "Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi", 1999-2010 yılları arasında TÜBİTAK-ULAKBİM ve CAB International'ın Yaşam Bilimleri Veritabanlarında yer alan "Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi" adı ile yayınlanmıştır.

This journal was published with the name of "The Journal of Bornova Veterinary Control and Research Institute", which was in Life Sciences Databases of TUBİTAK-ULAKBİM ve CAB International, between 1999 and 2010 and "The Journal of Veterinary Control and Research Institute Directorate" until 1999.

BORNOVA VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

The Journal of Bornova Veterinary Science

ISSN 2146-7447

Cilt/Volume**: 34 Sayı/**Number: **48 Yıl/**Year: **2012**

© Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi. Tüm hakları saklıdır / All rights reserved. Hakemli bir dergidir.

Bu derginin tamamı ya da dergide yer alan bilimsel çalışmaların bir kısmı ya da tamamı 5846 sayılı yasanın hükümlerine göre Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nün yazılı izni olmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemi ile çoğaltılamaz, yayımlanamaz.

Basım Tarihi/ Publishing Date: Aralık 2012/ December 2012. Baskı Adedi / Print Count: 500.

Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri
87 Sok. No. 4 / A Bornova
☎ (0.232) 343 64 54 ✉ metabasim@gmail.com
İzmir, 31 Aralık - 2012

İÇİNDEKİLER
CONTENTS

Araştırma Makaleleri/ *Research Articles*

Vaka Raporu/ *Case Report*

Bornova Vet. Bil. Derg.,
34 (48): 1-8, 2012

EGE BÖLGESİNDEKİ LEVREK (*DİCENTRARCHUS LABRAX L.*) VE ÇİPURA (*SPARUS AURATA L.*) İŞLETMELERİNDE VİRAL NERVÖZ NEKROZİS HASTALIĞININ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI*

THE INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF VIRAL NERVOUS NECROSIS DISEASE IN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX L.*) AND SEA BREAM (*SPARUS AURATA L.*) FARMS IN THE AEGEAN REGION

Buket ÖZKAN ÖZYER[1] Gülnur KALAYCI[2] Şerife İNÇOĞLU[3]

Geliş Tarihi (Received): 13.08.2012 Kabul Tarihi (Accepted): 28.11.2012

ÖZET

Bu projede Ege bölgesinde yer alan levrek ve çipura işletmelerinde viral nervöz nekrozis (VNN) hastalığının varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla levrek ve çipura işletmelerinden temin edilen larva ve/veya yavru balıklar kullanılmıştır. Hastalığın teşhisi amacıyla hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben identifikasyon için immun floresan antikor testi (IFAT) ve reverse transcriptase/polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) teknikleri uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda, Ege Bölgesinde yer alan levrek ve çipura işletmelerinde VNN hastalığının varlığı tespit edilmemiştir.

Anahtar kelimeler: Çipura, levrek, IFAT, RT-PCR, SSN-1, teşhis, VNN.

SUMMARY

In this project, the presence of viral nervous necrosis (VNN) disease was investigated in sea bass and sea bream farms in the Aegean Region. For this purpose, larvae and/or juvenil fish which was obtained from sea bass and sea bream farms were used. For diagnosis of disease, virus isolation was performed on cell culture followed by identification using immuno fluorescence antibody test (IFAT) and reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR). At the end of study, the presence of VNN disease was not determined in sea bass and sea bream farms in the Aegean Region.

Key words: Diagnosis, IFAT, sea bass, sea bream, RT-PCR, SSN-1,VNN.

GİRİŞ

Viral nervöz nekrozis (VNN) veya viral ensefalopati ve retinopati (VER) özellikle larva ve yavru deniz balıklarında, bazen de yetişkinlerde bildirilen önemli bir hastalıktır. Hastalık dünyada geniş bir dağılıma sahip olup günümüze kadar en az 40 balık türünden rapor edilmiştir (14,18). Hastalığın en fazla etkilediği balık türleri arasında *Dicentrarcus labrax, Lates calcarifer, Epinephelus sp., Cromileptes altivelis, Pseudocaranx dentex, Oplegnathus fasciatus, Takifugu rubripes, Verasper moseri, Hippoglossus hippoglossus, Paralichthys olivaceus, Scophthalmus maximus* yer almaktadır (3, 8, 10, 12, 13, 17). Virus ayrıca akvaryum balıklarından, çift kabuklu yumuşakçalardan, karideslerden ve kabuklulardan da izole edilmiştir (6).

* TAGEM/HS/09/02/07/124 no'lu projeden özetlenmiştir.

[1] Dr. Vet. Hekim, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[2] Dr. Uzm. Vet. Hekim, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[3] Dr.Biyolog, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR

Hastalığın etkeni Nodaviridae familyası Betanodavirus genusunda yer almaktadır. Etken 25-30 nm büyüklüğünde, zarfsız ve ikozahedral morfoloji ile karakterizedir (3, 17).

Genomik sınıflandırma T4 değişken bölgenin (kapsid proteinini kodlar) filogenetik analizine göre yapılmış ve 4 genotip tanımlanmıştır. Bu genotipler striped jack nervöz nekrozis (SJNNV), tiger puffer nervöz nekrozis (TPNNV), red spotted grouper nervöz nekrozis (RGNNV) ve barfin flounder nervöz nekrozis (BFNNV)'dir. Serolojik olarak 3 serotip tanımlanmıştır. Serotip A ve B'nin sırası ile genotip SJNNV ve TPNNV ile ilgili, Serotip C'nin ise genotip RGNNV ve BFNNV ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (16, 21, 24).

Klinik semptomlar, retina ve merkezi sinir sisteminde meydana gelen lezyonlar sonucunda gelişmektedir. Tür ve yaşa göre değişkenlik göstermekle birlikte başlıca belirti yüzeye yakın ve dairesel şekilde olan yüzme bozukluğudur. İştahsızlık ve pigmentasyon bozuklukları da görülmektedir. Semptomlar ve mortalite, etkilenen balık türüne ve enfeksiyon yoluna göre değişmektedir. Mortalite oranının larva ve yavrularda yüksek olmasına rağmen *Pseudocaranx dentex, Epinephelus septemfaciatus* ve levreklerin ticari boyutlarında da mortaliteler bildirilmiştir (12, 17). Klinik semptomların görünümü su sıcaklığı ile ilişkilidir. Levreklerde tipik klinik belirtiler 23-25ºC'nin üzerinde görülmektedir. Nadir olarak VNN salgınları az veya klinik belirti göstermeksizin görülebilmektedir (6).

Patolojik olarak hava kesesi hiperinflamasyonu, levrek, *Lates calcarifer* ve *Pseudocaranx dentex'* lerde özellikle larva aşamalarında bildirilmiştir. Bazı vakalarda beyin üzerinde kafatası derisinde depigmentasyon, genişlemiş operkula, çene lezyonları ve kafa bölgesinde kızarıklık bildirilmiştir. Histopatolojik olarak tipik bulgu özellikle klinik semptom gösteren balıklarda sinir hücrelerinde nekroz ve vakuolizasyondur. Lezyonlar beynin farklı bölümlerinde (mezensefalon, metensefalon, telensefalon, medulla oblangata), spinal kordta ve retinanın granüler tabakasında tespit edilebilmektedir. (8, 12, 15, 19, 20, 23). Vakuollerin sayısı ve büyüklüğü etkilenen balık türü ve yaşına göre önemli derecede değişebilmektedir. Ciddi lezyonlar özellikle larval ve yavru dönemlerinde gözlenmektedir. Genellikle hem intra hemde extra vakuoller retinanın granüler tabakasında ve metensefalonda çok sayıdadır (15).

Yetişkin levreklerde histopatolojik lezyonlar ve semptomlar oldukça azdır. Bağırsak mukozasının vakuolizasyonu ve epitel dökülmeleri (hyalin droplet formasyonu) bildirilmiştir. Histopatolojik değişiklikler bazen karaciğer, böbrek, kalp, barsak ve iskelet kaslarında da görülebilir (10, 13, 23).

Enfeksiyonun başlıca kaynağı asemptomatik taşıyıcı balıklardır. Akdeniz bölgesinde önemli hedef konakçı olan levrekler için çipuraların sağlıklı taşıyıcı olarak rol alan türler olduğu düşünülmektedir (2, 4). Hastalığın yayılımında diğer bir risk faktörü de çevrede bulunan doğal türlerdir (7).

Betanodavirus enfeksiyonları nörotropisme sahiptir. *Pseudocaranx dentex* larvalarında viral replikasyonun spinal kordta başladığı buradan beyin daha sonra optik sinir aracılığı ile retinaya ulaştırıldığı bildirilmektedir. Aynı türün yetişkinlerinde immun floresan antikor tekniği (IFAT) ile viral antijenin gonadlar, bağırsaklar, mide, böbrekler ve karaciğerde varlığı tespit edilmiş fakat merkezi sinir sistemi ve retinada gösterilememiştir. Bu da taşıyıcı ve klinik olarak enfekte balıklar arasında fark olduğunu göstermektedir (11, 22).

Solungaç ve lateral line, virus penetrasyonu için ilk bölgedir. Virusun primer replikasyonunun ön bağırsak epitelyumunda olduğu düşünülmektedir. Olfaktor lobda viral antijenin tespit edilmiş olması nasal kavitenin de virusun giriş bölgesi olduğunu düşündürmektedir. Virusun saçılması dışkı ve cinsel sıvılarla olmaktadır (17). Deneysel olarak hastalık kohabitasyon, oral, banyo, intraperitoneal ve intramuskuler inokulasyon yolları ile oluşturulabilmiştir (23).

Enfeksiyonun yüksek prevalansının oldukça erken larval aşamada ve yavrularda görülmesi vertikal bulaşma ihtimalinin yüksek olduğunu düşündürmesine rağmen tam olarak net değildir. Özellikle larvalarda canlı yem olarak kullanılan artemia ve rotiferlerin mekanik vektör olarak rol aldığı düşünülmektedir. Anaçların beslenmesinde kullanılan çiğ balıklar da hastalık bulaşmasında bir ihtimaldir (14, 17).

Viral nervöz nekrozis hastalığının tanısı Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE)'nün su hayvanları için diagnostik testler el kitabına göre asemptomatik balıklarda striped snakehead fish fry (SSN-1) veya E-11 hücre kültürlerinde izolasyon ve takiben IFAT veya reverse transcriptase/polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile identifikasyon yapılmaktadır. Klinik vakalarda teşhis ise virus izolasyon metoduna ek olarak direkt dokudan IFAT, immunohistokimya (IHC) veya RT-PCR kullanılarak yapılabilmektedir (1).

Virus izolasyonunda SSN-1 hücre hattı kullanılmaktadır (5, 9). SSN-1 hücrelerinde sitopatik etki (CPE) 3. günde görülmeye başlamaktadır. Bu etki hücre monolayeri boyunca düzensiz yayılmış intrasellüler vakuoller ile karakterizedir. Vakuollerin sayısı ve şekli, 72 saat sonra önemli ölçüde artar ve tamamen yıkımlanmaya kadar hücresel lizis devam eder. Virusun identifikasyonu amacıyla ELISA testi uygulanmış ve oldukça da duyarlı bulunmuştur. IFAT hem hücre kültüründen hem de semptom gösteren balıkların beyin kesitlerinden identifikasyonda önerilen bir testtir (1, 9). Moleküler tekniklerden ise RT-PCR testi önerilen standart teşhis metotlarından birisidir (1, 21, 22).

Hastalığın kontrolünde epidemiyolojik verilerin ve hastalığın patojenik mekanizmasında ki bilgilerin yetersizliği nedeniyle oldukça zorluklar vardır. Sıkı hijyenik tedbirlerin alınması (alet ekipmanın dezenfeksiyonu, araçların dezenfeksiyonu, ziyaretçilerin giriş çıkışının kontrolü gibi), anaç balıklarda taşıyıcılığın belirlenmesi ve taşıyıcı anaçların popülasyondan çıkarılması, çiftliğe yeni alınan balıklarda karantinanın uygulanıp kontrol testlerinin yapılması önemlidir (7). Hastalığın potansiyel taşıyıcısı olan yabani hayvanlara dikkat edilmelidir. Resmi survey programlarının uygulanması da hastalığın kontrolünde oldukça önemlidir.

Ülkemizde yapılan kültür balıkçılığı toplam üretiminin % 30'unu levrek, % 24'ünü çipura oluşturmaktadır. Ayrıca levrek ve çipura yetiştiriciliği, Ülkemiz hayvancılık sektöründe özellikle Avrupa Birliği ülkelerine (Yunanistan, İtalya, İspanya, Fransa) yapılan ihracatta da ekonomik öneme sahiptir.

Bu araştırma ile ciddi ekonomik kayıplara neden olan ve ülkemizde bugüne kadar tespit edilmeyen VNN enfeksiyonunun veya taşıyıcılığının levrek ve çipura kuluçkahanelerinin büyük ölçüde bulunduğu ve yetiştiriciliğin de çok yoğun olarak yapıldığı Ege Bölgesinde varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Referans Betanodavirus suşu: OIE'nin VNN Referans Laboratuvarından (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Italy) temin edilen virus, izolasyon ve identifikasyonda pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Hücre kültürü: OIE'nin VNN Referans Laboratuvarından (İtalya) temin edilen SSN-1 hücre hattı, virus izolasyonu ve IFAT uygulamasında kullanıldı.

Vasat: L-15 (HyClone), hücre hattı devamı ve virus izolasyon ve üretiminde kullanıldı.

Fötal Bovine Serum: Hücre hatlarının devamında ve virus üretme vasatına katılmak üzere kullanıldı (Biochrome).

Saha Materyalleri: Virus izolasyonunda kullanılmak üzere Ege Bölgesinde yer alan 310 levrek ve çipura işletmesinden % 95 güven seviyesinde, % 10 kesinlik sınırında, en az bir pozitif örnek bulmak üzere basit rastgele örnekleme yapıldı. Bu amaçla ruhsatlı kuluçkahanelerin tamamından (15 işletme) ve yüksek kapasiteli işletmelerden tesadüfü örnekleme ile seçilen İzmir (Dikili, Çeşme, Urla, Karaburun, Bergama, Seferihisar), Muğla (Milas, Bodrum) ve Aydın (Didim, Söke)'daki işletmelerden örnek alınması hedeflendi. Ancak kuluçkahanelerde veya seçilen işletmelerde örnekleme dönemlerinde balık bulunmamasına bağlı olarak 1. yıl 8 kuluçkahane 16 işletme, 2. yıl 12 kuluçkahane 17 işletmeden örnekleme yapıldı. Örnekler olası virusun tespit edilebilme olasılığını arttırmak için su ısısının 25ºC ve üzerine çıktığı temmuz-eylül ayları arasında alındı.

Hiperimmun Serum: Ticari monoklonal antinodavirus antikoru (Anti-Nodavirus monoclonal antibody, Aquatic Diagnostics Ltd.) identifikasyon amacıyla uygulanan IFAT'ta kullanıldı.

Konjugat: Ticari FITC ile işaratli antimouse immunoglobulin serum (Sigma) IFAT'ta kullanıldı.

RNA Ekstraksiyon Kiti: Ticari olarak sağlanan kit (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) kullanım protokolüne göre uygulandı.

Primerler: SJNN virusunun RNA2 geninin (kapsid protein geni) 427 bp'lik bölümünü amplifiye eden R3 (5'-CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA-3') ve F2 (5'-CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT-3') primerleri kullanıldı.

Metot

SSN-1 Hücre Kültürünün Hazırlanması: Sıvı azot tankında muhafaza edilen SSN-1 hücre kültürü 24ºC'de çözdürülüp % 10 FBS, % 1 HEPES içeren L-15 vasatı ile sulandırılarak flasklarda 24ºC'de monolayer hücre kültürü oluşması için 48-72 saat inkübe edildi. Bunlardan aynı şekilde çalışma hücre stoğu hazırlandı. Çalışma hücre stoğundan virus izolasyon çalışmasında kullanılmak üzere 24 saatte monolayer olacak şekilde 24 gözlü doku kültürü pleytleri hazırlandı.

Virus İzolasyonu İçin Saha Materyalinin Hazırlanması: Sahadan toplanan balık numunelerine ötanazi (Tricaine methane sulfonate (TMS, MS 222) 500 mg/L, Benzokain hydrklorit 250 mg/L) uygulandıktan sonra larva veya 4 cm den küçük balıklar bütün olarak, 4-6 cm boyundaki balıklarda göz, beyin ve böbreği de içeren tüm iç organlar, 6 cm'den büyük balıklarda beyin, spinal kord ve göz ile ayrı bir grup olarak ta karaciğer, dalak, anterior böbrek ve kalp alınarak 5 balıktan bir örnek oluşturacak şekilde 1/10 oranında materyal hazırlama vasatı (EMEM, % 5 FBS, % 1 antibiyotik-antimikotik) ile homojenize edildi ve 0,2 µm filtreden geçirildi. Olası taşıyıcılığı saptamak için ayrıca büyük balıklardan iç organ örnekleri de aynı şekilde alınıp hazırlandı. Daha sonra 24 saatlik monolayer olan 24 gözlü pleytlerde üretilen SSN-1 hücre kültürüne her bir gruptan 1/10 ve 1/100 dilüsyonda ekim yapıldı ve 1 saat oda sıcaklığında adsorbsiyona bırakıldı. Sonra virus üretme vasatı (L-15 , % 5 FCS, % 1 antibiyotik-antimikotik) ilave edilerek 25ºC'de inkube edildi. Sitopatik etki yönünden 10 gün gözlendi ve süre sonunda doku kültürü pleytleri donduruldup çözdürülerek yine 24 gözlü pleytlerde üretilen hücre kültürüne 2 pasaj daha yapıldı. Her doku kültür pleytinde 2 göz hücre kontrol bırakıldı. Her izolasyon çalışmasında bir doku kültürü pleytine de referans virus aynı şekilde inoküle edilerek pozitif kontrol olarak kullanıldı (1).

İndirek Floresan Antikor Testi: Standart betanodavirus suşundan ekim yapıldı ve 25ºC'de 48-72 saat inkübe edildi. PBS ile yıkama yapılıp metanol ile hücreler tespit edildi. Daha sonra ticari monoklonal antibetanodavirus antikor (Anti-Nodavirus monoclonal antibody, Aquatic Diagnostics Ltd.) ile 37ºC'de inkübe edildi. Sonra PBS-T ile yıkama işleminden sonra ticari FITC ile işaretli konjugat (Sigma) ilave edilip 37ºC'de beklendi. PBST ile yıkama işlemi yapılıp floresan mikroskopta incelendi (1).

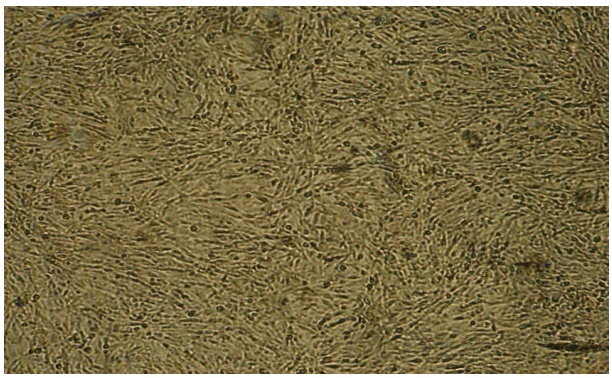
RNA İzolasyonu: SSN-1 hücre hattından pozitif kontrol olarak kullanılan betanodavirus suşundan ve negatif kontrol olarak kullanılan hücre kontrollerinden RNA'nın izolasyonu için ticari kit (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) protokolüne uygun olarak kullanıldı.

RT-PCR: RT-PCR analizinde Nishizawa ve ark. (22) tarafından bildirilen yöntem ile RNA2 (kapsid protein geni)'nin 427 bp'lik bölümü amplifiye edildi. Analiz için ticari RT-PCR kiti (One Step RT-PCR Kit, Qiagen) kullanıldı. RT işlemi 42ºC'de 30 dakikada gerçekleştirildi. Reverse transkriptaz enziminin inaktivasyonu 99ºC'de 10 dk ile sağlandı. Daha sonra PCR işlemi için thermal cycler'da 1 siklus 72ºC'de 10 dk ve 95ºC'de 2 dk., 25 siklus 95ºC'de 40 sn, 55ºC'de 40 sn ve 72ºC'de 40 sn ve son olarak 72ºC'de 5 dk sürecek şekilde program uygulandı. Amplifiye edilen cDNA % 2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutularak ethidium bromid ile boyanıp bantlar gözlendi (1, 22).

BULGULAR

Bu çalışmada 2 yıl örnekleme yapılmıştır. Çalışmanın 2010 yılında yapılan örnekleme yerleri ve sonuçları Tablo 1'de, 2011 yılında yapılan örnekleme yerleri ve sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

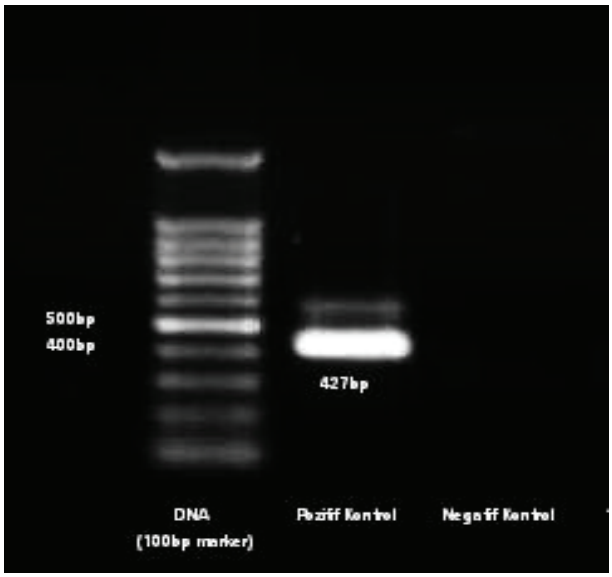
Çalışmada iki örneklemede toplam 1470 adet levrek ve 1290 adet çipuradan oluşturulan gruplardan SSN-1 hücre hattına virus izolasyonu amacıyla inokülasyonlar yapılmıştır. Şekil 1'de negatif kontrol ve Şekil 2'de pozitif kontrolün SSN-1 hücre hattında görünüşü verilmiştir.



Şekil 1. SSN-1 Hücre hattında negatif kontrol.

Şekil 2. SSN-1 Hücre hattında referans betanodavirusu sitopatik efekti (Pozitif kontrol).

SSN-1 hücre hattında sitopatik efekt gösteren referans betanodavirus (pozitif kontrol) ve hücre kontrollerden (negatif kontrol) alınan örneklere uygulan RT-PCR Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. RT-PCR ile referans betanodavirusun % 2'lik agaroz jel görüntüsü.

Tablo 1. 2010 yılı örnekleme yapılan yerler ve sonuçları.

İşletme No (2010)	İşletme Tipi	İl	Örneklenen Balık Türü		Sonuç
			Levrek	Çipura	
1.	Kuluçkahane	AYDIN	30	30	Negatif
2.	Kuluçkahane	AYDIN	30	30	Negatif
3.	Kuluçkahane	AYDIN	30	30	Negatif
4.	Yetiştirme	İZMİR	30	-	Negatif
5.	Yetiştirme	IZMIR	30	30	Negatif
6.	Yetiştirme	IZMIR	30	-	Negatif
7.	Yetiştirme	İZMİR	30	30	Negatif
8.	Yetiştirme	İZMİR	-	30	Negatif
9.	Kuluçkahane	İZMİR	30	30	Negatif
10.	Yetiştirme	İZMİR	30	30	Negatif
11.	Yetiştirme	IZMIR	30	-	Negatif
12.	Yetiştirme	IZMIR	30	30	Negatif
13.	Yetiştirme	IZMIR	-	30	Negatif
14.	Yetiştirme	IZMIR	30	-	Negatif
15.	Yetiştirme	İZMİR	30	30	Negatif
16.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
17.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
18.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
19.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
20.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
21.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	-	Negatif
22.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
23.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
24.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
Toplam			660	570	

Tablo 2. 2011 yılı örnekleme yapılan yerler ve sonuçları.

İşletme No (2011)	İşletme Tipi	İl	Örneklenen Balık Türü		Sonuç
			Levrek	Çipura	
1.	Kuluçkahane	AYDIN	30	30	Negatif
2.	Kuluçkahane	AYDIN	-	30	Negatif
3.	Yetiştirme	İZMİR	30	-	Negatif
4.	Yetiştirme	İZMİR	-	30	Negatif
5.	Yetiştirme	IZMIR	30	30	Negatif
6.	Yetiştirme	IZMIR	30	30	Negatif
7.	Yetiştirme	İZMİR	30	-	Negatif
8.	Yetiştirme	İZMİR	30	-	Negatif
9.	Yetiştirme	İZMİR	30	-	Negatif
10.	Yetiştirme	İZMİR	30	30	Negatif
11.	Kuluçkahane	IZMIR	-	30	Negatif
12.	Kuluçkahane	IZMIR	30	30	Negatif
13.	Kuluçkahane	IZMIR	30	30	Negatif
14.	Kuluçkahane	IZMIR	30	30	Negatif
15.	Kuluçkahane	İZMİR	30	30	Negatif
16.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
17.	Yetiştirme	MUĞLA	30	-	Negatif
18.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
19.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
20.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
21.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
22.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
23.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
24.	Yetiştirme	MUĞLA	30	30	Negatif
25.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
26.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
27.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
28.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	-	Negatif
29.	Kuluçkahane	MUĞLA	30	30	Negatif
Toplam			810	720	

TARTIŞMA VE SONUÇ

Viral nervöz nekrozis özellikle larva ve yavru deniz balıklarında, bazen de yetişkinlerde bildirilen önemli bir hastalıktır. VNN özellikle larva ve yavru balıklarda yüksek mortaliteye neden olur. Mortalite oranı levreklerde % 100'e kadar ulaşabilmektedir. Çipuraların asemptomatik hastalık taşıyıcısı olmaları hastalığın yayılımında önem arz etmektedir (1, 18). Levreklerde tipik klinik belirtiler 23-25ºC'nin üzerinde görülmektedir. Nadir olarak VNN salgınları az veya klinik belirti göstermeksizin görülebilmektedir (6). Bu nedenle örneklemeler, su ısısının 25ºC'nin üzerine çıktığı dönemlerde yapılmıştır. Hastalığa yavru balıklar daha duyarlı olduğu için tüm kuluçkahaneler örnekleme kapsamına alınmıştır.

VNN hastalığının tanısında hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben PCR ve IFAT ile identifikasyon standart metotlardır (1, 21). Levreklerden betanodavirusun izolasyonu ile ilgili EPC (epitelioma papullosum cyprini), FHM (fathead minnow) ve SSN-1 balık hücre hatları kullanılarak çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda EPC ve FHM hücre hatlarında herhangi bir sitopatik efekt görülmediği ancak SSN-1 hücre hattında 3. günde hücrelerde intrasellüler vakuoller ile karakterize

sitopatik efekt görülmeye başlandığı belirtilmiştir (5). Çipuralarda asemptomatik taşıyıcılığın belirlenmesi için yapılan çalışmada da SSN-1 hücre hattı kullanılmıştır (4). Ayrıca farklı sıcaklık derecelerinde SSN-1 hücre hattının inkübasyonu ile genotipik ayrımın yapılabildiği çalışmalar da bildirilmiştir. Bu çalışmalarda 15-20ºC BFNNV genotipi, 20ºC TPNNV genotipi, 20-25ºC SJNNV genotipi ve 25-30ºC RGNNV genotipi için sitopatik efekt oluşturan optimum sıcaklıklar olarak gösterilmiştir (9). RT-PCR metodu ile ilgili çalışmalarda asemptomatik veya düşük titreli virus taşıyan örneklerde hücre kültürü ile kombine yapılan RT-PCR metodunun daha hızlı ve kullanışlı olduğu belirtilmiştir. Standart olarak hücre kültüründe izolasyonda SSN-1 ve E-11 hücre hatları kullanılmaktadır (1, 9). Bu çalışmada da bu nedenlerle SSN-1 hücre hattı kullanılmış ve 25ºC'de inkübe edilmiştir. İki yıl boyunca örnekleme yapılan çiftliklerden toplam 1440 adet levrek ve 1260 adet çipura alınmıştır. Bu balıklardan beşerli gruplar halinde beyin ve gözler ayrıca taşıyıcılığın belirlenmesi için de iç organ örnekleri alınmıştır. SSN-1 hücre hattına yapılan ekimler ve takiben yapılan üç kör pasaj sonucunda herhangi bir sitopatik efekt tespit edilmemiştir. Ancak pozitif kontrol olarak kullanılan referans betanodavirus suşu ile yapılan ekimler sonucunda sitopatik etki tespit edilmiştir. Referans betanodavirus suşu hücre kültüründe çoğaltılmasından sonra testlerde pozitif kontrol olarak kullanılacağından standart metot olan RT-PCR ve IFAT uygulanmış ve pozitif sonuçlar alınmıştır.

VNN hastalığı çipura balıklarında Akdeniz ülkelerinden Fransa ve İtalya'dan, levreklerde ise Yunanistan, İtalya, İsrail, İspanya, Portekiz, Fransa ve Malta gibi ülkelerden bildirilmiştir (2, 4, 14). Ülkemizde Balık Hastalıkları Referans Laboratuvarı olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümünde yapılan rutin muayenelerde ve proje kapsamında yapılan örneklemelerde Ege Bölgesinde VNN hastalığı etkeni olan betanodavirus izole edilmemiştir. Ancak halen epidemiyolojik taramalar diğer levrek ve çipura işletmelerini kapsayacak şekilde devam etmektedir. Bu araştırmada örnekleme yapılan işletmelerden elde edilen bilgilerden ülkemizde bulunan çiftlikler arasında canlı levrek ve çipura alışverişinin olduğu tespit edilmiş ve ithalat ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu da komşu ülkelerde VNN hastalığının görülmüş olmasına rağmen, ülkemizde dış ülkeler ile canlı levrek ve çipura hareketinin olmamasının kontamine olma riskini azalttığını düşündürmektedir.

Çalışmada Ülkemizde yapılan kültür balıkçılığının toplam üretiminin çok büyük bölümünü oluşturan levrek ve çipura işletmelerinin yer aldığı Ege Bölgesi'nde özellikle levreklerde % 100 ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan, çipuralarda ise taşıyıcılığın önemli olduğu VNN hastalığının iki yıllık taraması yapılmıştır. Sonuç olarak VNN enfeksiyonu saptanmamıştır. Ülkemizde yer alan diğer çiftliklerin ve kuluçkahanelerin VNN hastalığı yönünden düzenli olarak takip edilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Anonim** (2006) *Viral encephalopathy and retinopathy*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Fifth edition. OIE.12, rue de Prony, Paris. 169-176.
2. **Aranguren, R., Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A.** (2002) *Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus to sea bream, Sparus aurata L., using different infection models*. J. Fish Dis., 25: 317-32.
3. **Bloch, B., Gravningen, K., Larsen, J.L.** (1991) *Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent.* Dis. Aquat. Org., 10: 65-70.
4. **Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., De Kinkelin, P., Raymond, J.C.** (2001) *Sea bream Sparus aurata, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus.* Dis. Aquat. Org., 47: 33-38.
5. **Frerichs, G.N., Rodger, H.D., Peric, Z.** (1996) *Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, Dicentrarchus labrax.* J. Gen. Virol., 77: 2067-2071.
6. **Gomez, D.K., Lim, D.J., Baeck, G.W., Youn, H.J., Shin, N.S., Youn, H.Y., Hwang, C.Y., Park, J.H., Park, S.C.** (2006) *Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates.* J. Vet. Sci., 7: 369-374.
7. **Gomez, D.K., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y., Nakai, T.** (2004) *PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs.* J. Fish Dis., 27: 603-608.
8. **Grove, S., Johansen, R., Dannevig, B.H., Reitan, L.J., Ranheim, T.** (2003) *Experimental infection of Atlantic halibut Hippoglossus hippoglossus with nodavirus: tissue distribution and immune response*. Dis. Aquat. Org., 53: 211-221.

9. **Iwamoto, T., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T.** (1999) *High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses.* Dis. Aquat. Org., 39: 37-47.

10. **Johansen, R., Grove, S., Svendsen, A.K., Modahl, I., Dannevig, B.** (2004) *A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, Hippoglossus hippoglossus (L.), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy.* J. Fish Dis., 27: 327-341.

11. **Johansen, R., Sommerset, I., Torud, B., Korsnes, K., Hjoryaas, M., Nilsen, F., Nerland, A.H., Dannevıg B.H.** (2004) *Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, Scophthalmus maximus (L.)*. J. Fish Dis., 27: 591-601.

12. **Le Breton, A., Grıiez, L., Sweetman, J., Olievier, F.** (1997) *Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, Dicentrarchus labrax (L.).* J. Fish Dis., 20: 145-151.

13. **Maeno, Y., De La Pena, L.D., Cruz-Lacierda, E.R.** (2004) *Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared sea bass Lates calcarifer in the Philippines*. JARQ. 38: 69-73.

14. **Maltese, C., Bovo, G.** (2007) *Viral encephalopathy ant retinopathy.* Ittiopatologia, 4: 93-147.

15. **Mladineo, I.** (2003) *The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue.* J. Appl. Ichthyol. 19: 366-370.

16. **Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S., Nakai, T.** (2003) *Serological relationships among genoyypic variants of betanodavirus.* Dis. Aquat. Org., 57: 19-26.

17. **Munday, B.L., Kwang, J., Moody, N.** (2002) *Betanodavirus infections of teleost fish: a review.* J. Fish Dis., 25: 127-142.

18. **Nagai, T., Nishizawa, T.** (1999) *Aequence of the non-structural protein gene encoded by RNA 1 of striped jack nervous necrosis virus.* J. Gen. Virol., 80: 3019-3022.

19. **Nguyen, H.D., Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K.** (1997) *Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack.* Dis. Aquat. Org., 28: 87-91.

20. **Nguyen, H.D., Nakai, T., Muroga, K.** (1996) *Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack Pseudocaranx dentex larvae.* Dis. Aquat. Org., 24: 99-105.

21. **Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T., Muroga, K.** (1997) *Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene.* Appl. Environ. Microbiol., 63: 1633-1636.

22. **Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K.** (1994) *Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)*. Dis. Aquat. Org., 18: 103-107.

23. **Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Le Ven, A., Baudin Laurencin, F.** (1999) *Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass Dicentrarchus labrax infected in different ways*. Dis. Aquat. Org., 36: 11-20.

24. **Tan, C., Huang, B., Chang, S.F., Ngoh, G.H., Munday, B.L., Chen, S.C., Kwang, J.** (2001) *Determination of the complete nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (Epinephelus tauvina) nervous necrosis virus, Singapore strain.* J. Gen. Virol., 82: 647-653.

.

Yazışma Adresi:

Dr. Buket ÖZKAN ÖZYER
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Viroloji Bölümü
35040 Bornova-İZMİR
E-mail: ozbuket30@yahoo.com

Bornova Vet. Bil. Derg.,
34 (48): 9-16, 2012

PASTEURELLOSIS CASES IN SEA BASS AND SEA BREAM CULTURED IN THE AEGEAN REGION AND OTHER BACTERIA ISOLATED FROM THESE CASES

EGE BÖLGESİNDE KÜLTÜRE EDİLEN LEVREK VE ÇİPURALARDAKİ PASTEURELLOZİS VAKALARI VE BU VAKALARDAN İZOLE EDİLEN DİĞER BAKTERİLER

Meriç Lütfi AVSEVER[1] Ertan Emek ONUK[2] Necla TÜRK[3] Serra TUNALIGİL[1]
Seza ESKİİZMİRLİLER[1] Şerife İNÇOĞLU[4] Murat YABANLI[5]

Geliş Tarihi (Received): 29.08.2012 Kabul Tarihi (Accepted): 17.10.2012

SUMMARY

Photobacterium damselae subsp. *piscicida* was isolated from 6 (5.7 %) of 104 sea bass samples and from 10 (12.3 %) of 81 sea bream samples with clinical symptoms of Pasteurellosis presented to the National Reference Laboratory of Fish Diseases in Bornova Veterinary Control Institute between 2009- 2011. Besides, 2 *Pseudomonas anguilliseptica* and 2 *Aeromonas sobria* isolates were obtained in 4 of the pasteurellosis positive sea bass samples. 2 *Vibrio alginolyticus*, 1 *Vibrio vulnificus*, 1 *Pseudomonas flourescens*, 1 *Aeromonas sobria* and 3 *Aeromonas. hydrophila* isolates were obtained from 7 of the pasteurellosis positive sea bream samples. Bacterial isolation and identification were carried out with conventional microbiological methods. Identification of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates were confirmed with polymerase chain reaction (PCR) and other bacterial isolates with the VITEK-II compact system. Antibiotic susceptibility profiles of the bacterial isolates were elucidated through the Kirby-Bauer disc diffusion method. A great majority of the *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates (81.25 %) were sensitive to florfenicol (30 µg), whereas all isolates were resistant to amoxycillin (30 µg). There of the other bacteria (27.27 %) isolated from Pasteurellosis cases were differed from *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* in their antibiotic susceptibility patterns. These results showed the importance of the other bacterial agents in Pasteurellosis cases.

Key words: Antibiotic susceptibility, phenotypic characterization, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*.

ÖZET

Bu çalışmada, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Balık Hastalıkları Ulusal Referans Laboratuvarına 2009-2011 yılları arasında hastalık teşhisi amacıyla gönderilen, klinik olarak pasteurellozis semptomları gösteren 104 levrek örneğinin 6'sından (% 5.7) ve 81 çipura örneğinin 10'undan (% 12.3) *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* izole edildi. Ayrıca, Pasteurellosis pozitif levrek örneklerinin 4'ünden 2 *Pseudomonas anguilliseptica* ve 2 *Aeromonas sobria* izolatı elde edildi. Pasteurellozis pozitif çipura örneklerinin 7'sinden ise 2 *Vibrio alginolyticus*, 1 *V. vulnificus*, 1 *Pseudomonas flourescens*, 1 *A. sobria* ve 3 *A. hydrophila* izolatı elde edildi. Örneklerden bakteri izolasyonu, konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar ile yapıldı. İdentifikasyon sonuçları, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* izolatları için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile diğer etkenler için ise Vitek-2 compact sistemi ile doğrulandı. Elde edilen bakteriyel izolatların antibiyotik duyarlılık profilleri Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile ortaya konuldu. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* izolatlarının en fazla (% 81.25) florfenikol (30 µg)'e karşı duyarlı olduğu, amoksisiline (30 µg)'e karşı ise tüm izolatların dirençli olduğu gözlendi. Pasteurellozis vakalarından izole edilen diğer bakteriyel etkenlerden üçünün (% 27.27) *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*'dan farklı antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi. Bu sonuçlar, Pasteurellozis vakalarında diğer bakteriyel etkenlerin önemini de göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılığı, fenotipik karakterizasyon, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*.

[1] DVM, PhD, Bornova Veterinary Control Institute, Izmir, TURKEY.

[2] DVM, Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, TR-55139, Samsun-TURKEY

[3] DVM, Bornova Veterinary Control Institute, Izmir, TURKEY.

[4] Biologist, PhD, Bornova Veterinary Control Institute, Izmir, TURKEY.

[5] Biologist, Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Aquaculture and Fisheries, Muğla University, TR-48000, Mugla-TURKEY

INTRODUCTION

Aquaculture is one of the fastest improving sectors in the food production area in the world (11). In Turkey as well as in other countries, aquaculture and fisheries production has been improved by the application of scientific and technological innovations (12). According to data from 2010, aquaculture production increased by 5.3 % and 167.000 tons of production was achieved. 85.000 tons of trout occupied the first place and was followed by 50.500 tons of sea bass and 28.000 tons of sea bream (37). Infectious diseases are foremost among the significant problems which stall the development of this dynamic sector.

Bacterial diseases probably cause the greatest losses in the aquaculture sector. Pasteurellosis is one of the most important bacterial diseases in mariculture (4, 5, 21, 24, 38). Fish Pasteurellosis is a septicaemic bacterial disease caused by *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (previously *Pasteurella piscicida*), a halophillic bacterium. In chronic cases, the disease is called pseudotuberculosis due to the off-white tubercules containing bacterial clusters in the internal organs of infected fish (28). Conventional microbiological methods are frequently used in the isolation and identification of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (19, 23, 32, 35). Despite this, molecular based methods such as PCR are reported to be faster with lower costs and are also less laborious (27).

There are Pasteurellosis cases reported from our country in grey mullets and sea bass (19, 32). But, information regarding other bacterial agents isolated from these Pasteurellosis cases has not been found. The aim of this work was to research the phenotypic characteristics and antibiotic susceptibility profiles of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates obtained from sea bass and sea bream cultured in the Aegean Region and to draw attention to other bacterial agents accompanying Pasteurellosis.

MATERIAL and METHODS

The study materials consisted of 185 fish (104 sea bass, 81 sea bream) samples with clinical symptoms of Pasteurellosis that were presented to the National Reference Laboratory of Fish Diseases in Bornova Veterinary Control Institute between 2009-2011. For bacterial isolation, samples from internal organs (spleen, liver, kidney and heart) and damaged body surfaces were cultured in Tryptic Soy Agar (TSA, LABM), Brain Heart Infusion Agar (BHIA, LABM), Marine Agar (MA, DIFCO) and Blood Agar (BA, LABM). All media were supplemented with 1% NaCl. Afterwards, petri dishes were incubated for 24-48 hours in 25-28°C. After incubation, colonies were identified with conventional microbiological methods (2, 18, 23, 35). Identification tables according to Austin and Austin (2) were used for this purpose.

Isolates identified as *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* were confirmed with PCR. DNA extractions of the isolates were made with a commercial DNA extraction kit (Fermantas, K0721) based on spin-colon principle according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was carried out according to Rajan et al. (27) with CPSF (5'-AGGGGATCCGATTATTACTG-3') and CPSR (5'-TCCCATTGAGAAGATTTGAT-3') primers. As positive control, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* ATCC 17911 was used, while the negative control was distilled water. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* was differentiated according to the ability to grow in thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar (TCBS, LABM). As a result, isolates producing a final PCR product of 410 bp and not growing on TCBS were determined to be *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (27). Other bacterial isolates were confirmed with the VITEK II Compact system.

Antibiotic susceptibility profiles of all the bacterial isolates were elucidated through the Kirby-Bauer disc diffusion method (16). Florfenicol (FFC) 30 µg, Enrofloxacin (ENR) 5 µg, Flumequin (UB) 30 µg, Oxolinic acid (OA) 2 µg, Oxytetracycline (OT) 30 µg, Sulphamethaxazole-Trimethoprim (SXT) 25 µg, Erythromycin (E) 15 µg, Amoxicillin (AM) 30 µg and Doxycyclin (DO) 30 µg antibiotic discs (Oxoid, England) were used for this test. Initially, bacterial suspension of every isolate was adjusted to 0.5 McFarland ($1.5x10^8$ cfu/ml). Then 100 µl aliquots of these suspensions

were spread on Mueller-Hinton Agar (17). Antibiotic discs were placed on the surface and plates were incubated in 25-28°C for 24-48 hours. After the incubation period, inhibition zones around the discs were measured and compared with the reference values (1, 6, 8, 17, 26).

RESULTS

Macroscopic findings:

During the macroscopic examination of the fish samples, some samples revealed irregular ulcerations on the body surface with a diameter of 0.5-2.0 cm (Figure 1C). On other samples, disseminated zones of haemorrhage were seen on the operculum, abdomen, and gills (Figure 1A). In the abdominal cavity, petechial haemorraghes around the adipose tissue and the liver surface were remarkable. Liver was found to be yellowish-grey in color and elastic in texture. In some fish, grey-white nodules of variable size on the spleen and kidney were observed (Figure 1D, 1B).

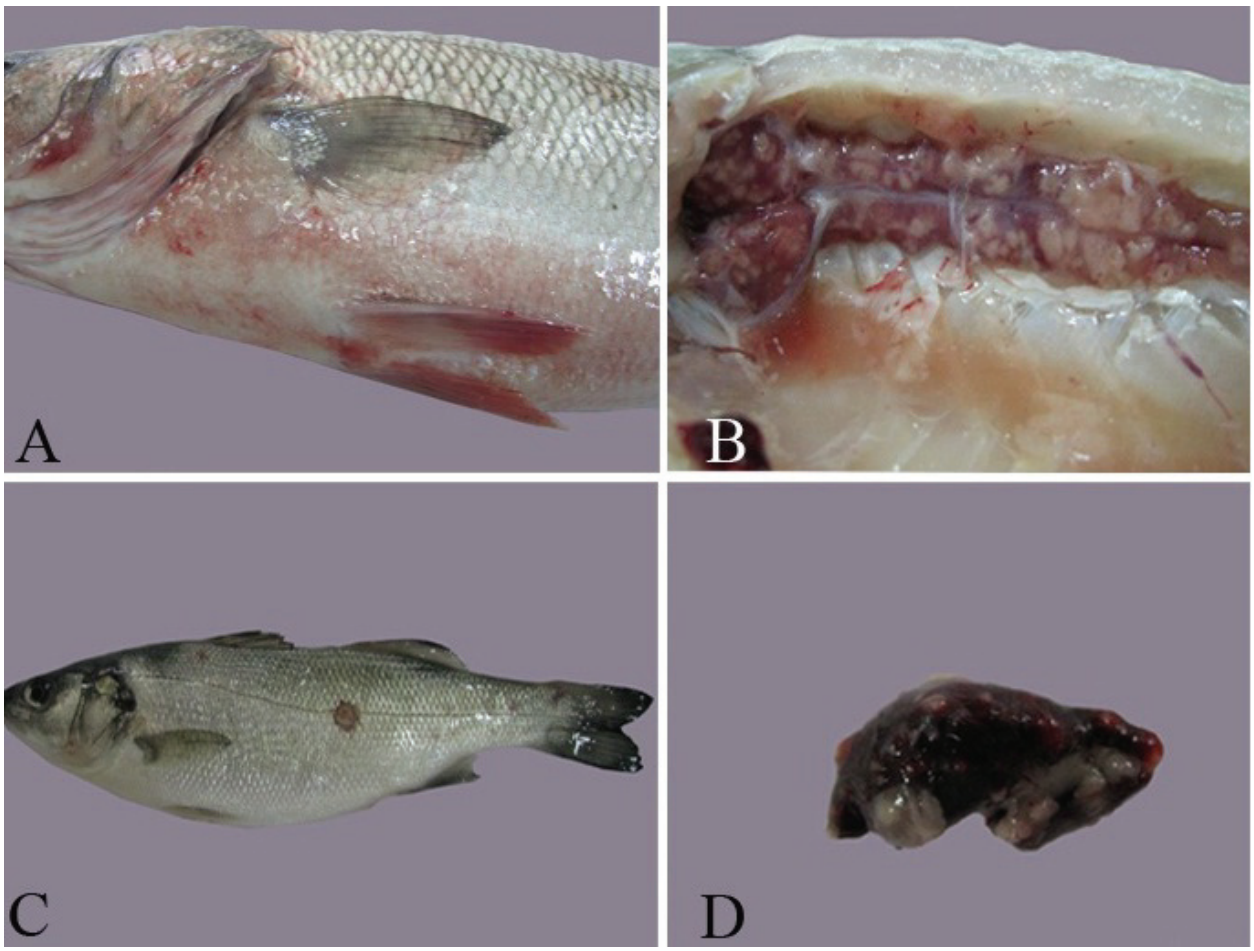


Figure 1. Macroscopic findings in fish. A; disseminated haemorrhage in operculum, abdomen, and gills. B; grey-white granulomas on the kidney surface. C; ulcerative changes on the side line, D; grey-white granulomas on the spleen.

Şekil 1. İncelenen balıklarda gözlenen makroskobik bulgular. A; operculum, abdomen ve solungaçta yaygın hemoraji, B; böbrek yüzeyinde gözlenen boz-beyaz renkte granülomatöz odaklar, C; yanal çizgi üzerinde gözlenen ülseratif değişiklikler, D; dalak yüzeyinde boz beyaz renkte granülomatöz odaklar.

Bacterial Isolation

Photobacterium damselae subsp. *piscicida was* isolated from 6 (5.7 %) of the 104 sea bass samples and from 10 (12.3 %) of the 81 sea bream samples with clinical symptoms of Pasteurellosis. Two *Pseudomonas anguilliseptica* and 2 *Aeromonas sobria* isolates were obtained in 4 of these pasteurellosis positive sea bass samples. *Vibrio alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Pseudomonas flourescens*, *A. sobria*, and *A. hydrophila* were obtained from 7 of the pasteurellosis positive sea bream samples in frequency of 2, 1, 1, 1, and 3 respectively. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates were divided under 3 groups following phenotypic characterization based on biochemical tests. These results were provided in Table 1.

Genetic confirmation of isolates by PCR

PCR was employed for the molecular confirmation of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates following phenotypic characterization. As a result, all of the 16 isolates produced the final PCR product of 410 bp (Figure 1). The strains that did not grow in the TCBS agar were also confirmed as *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*.

Table 1. Phenotypic characterization of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates.
Tablo 1. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu.

Characters	Phenogroup 1 (Including 5 isolates)	Phenogroup 2 (Including 9 isolates)	Phenogroup 3 (Including 2 isolates)
Morphology	Gram negative, coccobacilli bipolarity (+)	Gram negative, coccobacilli bipolarity (+)	Gram negative, coccobacilli bipolarity (+)
Motility	-	-	-
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
O/F	F	F	F
Indole	-	-	-
H_2S	-	-	-
ADH	-	+	+
LDH	-	-	-
ODH	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-
Haemolysis	-	-	-
Gelatin	-	-	-
Urea hydrolysis	-	-	-
Methyl red	+	+	+
VP	+	+	+
Growth in 37°C	-	-	-
Growth in %0 NaCI	-	-	-
Growth in %3 NaCI	+	+	+
Growth in %7 NaCI	-	-	-
Growth in TCBS	-	-	-
Growth in TSA (% 2 NaCl)	+	+	+
Growth in Marine Agar	+	+	+
0/129 (10 ug)	+	+	+
Acid from			
Glucose	+	+	+
Galactose	-	-	+
Fructose	-	-	+
Ribose	+	+	+
Maltose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Inositol	-	-	-

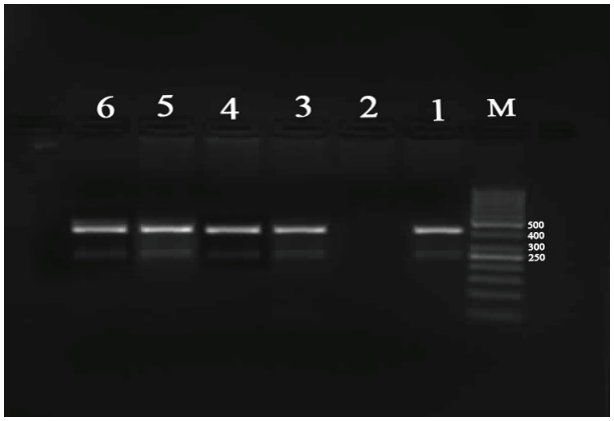


Figure 1. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* specific PCR, 410 bp. M; 50-bp DNA ladder, 1; *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* ATCC 17911, 2; Negative control (distilled water), 3-6; *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* field isolates.

Şekil 1. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* spesifik PZR, 410 bp. M; 50-bp DNA ladder, 1; *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* ATCC 17911, 2; Negatif kontrol (distile su), 3-6; *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* saha izolatları.

Susceptibility of the isolated strains to various antimicrobials:

13 of the *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates were found to be sensitive to FFC (81.25 %), 11 to ENR (68.75 %), 7 to SXT (43.75 %) and 6 to OA (37.5 %). Five of the isolates were found to be susceptible to E (31.25 %) and 4 of them (25 %) were sensitive to DO, OT and UB. All of the isolates were resistant to AM (Table 2). Among other bacterial isolates from the Pasteurellosis cases, two *A. sobria* and one *A. hydrophila* isolates were susceptible to antibiotics different from *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. One of these bacterial isolates were sensitive to AM, DO, E, SXT and OT (9.09 %), 2 were susceptible to UB (18.18 %), 5 were sensitive to ENR (45.45 %) and 7 were sensitive to FFC (63.63 %). All of these isolates were resistant to OA.

Table 2. Antibiotic susceptibility test results of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates.

Tablo 2. *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* izolatlarının antibiyogram duyarlılık sonuçları.

Antimicrobial Disc	Isolate No															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Florfenicol (30 µg)	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Enrofloxacin (5 µg)	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
Flumequin (30 µg)	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
Oxolinic acid (2 µg)	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
Oxytetracycline (30 µg)	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
Sulphamethaxazole-Trimethoprim (25 µg)	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S
Erythromycin (15 µg)	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
Amoxicillin (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Doxycyclin (30 µg)	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

* S: Sensitive, R: Resistant

DISCUSSION

In the light of the data obtained in this work; it can be concluded that *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* is an important pathogen in our country as well as the world, and other pathogenic bacteria can also be isolated from these cases.

Secondary infections accompanying the disease worsen the condition and make the treatment process difficult. In aquatic organisms, infections with multiple etiology have been previously reported (3, 25, 30, 31, 33). In this work, in 11 out of 16 cases, Gram negative bacterial pathogens such as *A. sobria*, *A. hydrophila*, *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* were isolated along with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida.* As these bacterial agents were isolated from primary infections in various fish species (10, 13, 14, 29, 36), it is assumed that they could have direct influence on the prognosis of Pasteurellosis.

When biochemical properties of the *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates were

taken into consideration, 3 phenotypic groups emerged. While ADH positive isolates were correlated with data obtained by Tanrıkulu and Çağirgan (32) from the Aegean Region, ADH negative isolates were correlated with the work carried out by Cagirgan (7) in the same region. Austin and Austin (2) reported that *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* would be negative for ADH, whereas DeKinkelin et al. (9) declared that some strains could be ADH positive. In this work, all *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates produced acid from ribose; this was found to be similar to the report made by Tanrıkulu and Çağirgan (32). But two isolates were differed in producing acid from galactose and fructose. This aspect was correlated with findings of Magarinos et al. (22) in Spain.

When the antibiotic susceptibility patterns of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates are taken into consideration, differences between reports were more prominent. The isolates in this work were found to be resistant to AM. But Lagana et al. (20) reported that 4 Pasteurella isolates obtained from in fish farms along the Mediterranean coast were the most sensitive to AM. Whereas, Kim and Aoki (15) declared that Pasteurella isolates from Europe were mostly sensitive to FFC, SXT and Kanamycin. This report corresponds with the findings of this work. Toranzo et al. (36) also has shown that FFC is the most common antibiotic used to combat Pasteurellosis. In another work, Thyssen and Ollevier (34) reported that *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates were highly susceptible to erythromycin (93 %). In our work, this ratio was found to be 68.25 %. The results of tests with other antibiotics were also similar with previous reports (15, 20, 34).

As a result of the antibiotic susceptibility tests of 11 cases in which other bacterial agents were isolated with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, 8 cases (72.8 %) revealed that *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and other bacterial pathogens were susceptible to similar antibiotics. Whereas, in 3 cases (27.2 %) they were found to be sensitive to different antibiotics. This result clearly shows that other bacterial agents in Pasteurellosis cases should also be taken into consideration.

Consequently, phenotypic characteristics of the *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolates were similar to other research from the region to a great extent. The differences were considered to be due to mutations and differences in sample origin. Still, genotyping is necessary to fully confirm this hypothesis. Antibiotic susceptibility test results were parallel with the reports from European countries. Besides this, most of the isolates from this work were found to be susceptible to FFC (93 %) and resistant to AM (100 %). Although antibiotic susceptibility patterns of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and other bacterial isolates were generally similar; 27.27% of the samples were found to be different in this aspect. Therefore, it was concluded that secondary bacterial pathogens and their antibiotic susceptibility patterns should be taken into consideration while providing treatment.

REFERENCES

1. **Alderman, D.J., Smith, P.** (2001) *Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases*. Aquaculture, 196: 211-243.
2. **Austin, B., Austin, D.A.** (2007) *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. pp 457. 3th ed.(Revised), Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
3. **Avsever, M.L., Hilmiğlu-Polat, S., Türk, N., Metin, D.Y.** (2011) *Tatlı su istakozlarından (Astacus leptodactylus) Saprolegnia sp. ve Aeromonas hydrophila izolasyonu.* Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 17 (5): 873-875.
4. **Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sedano, J., Martinez-Manzanares, E., Vidaurreta, A., Borrego, J.J., Toranzo, A.E.** (1992) *Isolation of Pasteurella piscicida from sea bass in southwestern Spain*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 12: 168-170.
5. **Balebona, M.C., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J.** (1998) *Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (Sparus aurata L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996*. Aquaculture, 166: 19-35.
6. **Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., de Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shryock, T., Shuster, D., Thomas, V., Vale, M., Walters, J.** (2004) *A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals*. J. Antimicrob. Chemother., 54 (4): 744-754.

7. **Çağırgan, H.** (1993) *The first isolation Pasteurella piscicida from cultured sea bream (Sparus aurata) in Turkey.* Hay. Araş. Derg., 3 (2): 82-83.
8. **Dalsgaard, I.** (2001) *Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria.* Aquaculture, 196: 267-275.
9. **De Kinkelin, P., Michel, C., Ghittino, P.** (1985) *Precis de Pathologie des Poissons*. INRA-OIE, Paris.
10. **Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Lawson, P., Garcia, J.A., Cutuli, M.T., Blanco, M., Gibello, A., Moreno, M.A., Collins, M.D., Dominguez, L.** (1997) *Winter disease outbreak in sea-bream (Sparus aurata) associated with Pseudomonas anguilliseptica infection*. Aquaculture, 156 (3-4): 317-326.
11. **FAO**. (2010) *The State of World Fisheries and Aquaculture.* Rome, FAO. p.197, 2010.
12. **Harlioglu**, **A.G.** (2011) *Present status of fisheries in Turkey.* Rev. Fish. Biol. Fisheries.**,** 21 (4): 667-680.
13. **Kahla-Nakbi, A.B., Chaieb, K., Bakhrouf, A.** (2009) *Investigation of several virulence properties among Vibrio alginolyticus strains isolated from diseased cultured fish in Tunisia.* Dis. Aquat. Organ., 86 (1): 21-28.
14. **Kahla-Nakbi, A.B., Chaieb, K., Besbes, A., Zmantar, T., Bakhrouf, A.** (2006) *Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of Vibrio alginolyticus strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks*. Vet. Microbiol., 117 (2-4): 321-327.
15. **Kim, E.H., Aoki, T.** (1993) *Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of Pasteurella piscicida isolated from cultured yellowtail in Japan*. Microbiol. Immunol., 37: 103-109.
16. **Kirby, W.M.M., Bauer, A.W., Sherris, J.C., Turck, M.** (1996) *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol., 45: 493-496.
17. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenerger, P.C., Winn, W.C.** (1992) *Antimicrobial susceptibility testing*. Diagnostic Microbiology. pp. 609-668. 4th. ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
18. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenber, P.C., Winn, W.C.** (1997) *Color Atlas of Diagnostic Microbiology*, pp. 121-162. 5th ed., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, USA.
19. **Korun, J. Timur, G.** (2005) *The first pasteurellosis case in cultured sea bass (Dicentrarchus labrax L.) at low marine water temperatures in Turkey.* The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh, 57 (3): 197-206.
20. **Lagana, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zaccone, R., Delia, S.** (2011) *Susceptibility to antibiotics of Vibrio spp. and Photobacterium damsela ssp. piscicida strains isolated from Italian aquaculture farms*. New. Microbiol., 34: 53-63.
21. **Le Breton, A.D.** (1999) *Mediterranean fin fish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 19: 250-253.
22. **Magarinos, B., Romalde, J.L., Bandin, I., Fouz, B., Toranzo, A.E.** (1992) *Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of Pasteurella piscicida strains isolated from fish*. Appl. Environ. Microbiol., 58 (10): 3316-3322.
23. **Magarinos, B., Toranzo, A.E., Romalde, J.L.** (1996) *Phenotypic and pathobiological characteristics of Pasteurella piscicida*. Annu. Rev. Fish. Dis., 6: 41-64.
24. **Martinez-Manzanares, E., Tapia-Paniagua, S.T., Diaz-Rosales, P., Chabrillon, M., Morinigo, M.A.** (2008) *Susceptibility of Photobacterium damselae subsp. piscicida strains isolated from Senegalese sole, Solea senegalensis Kaup, and gilthead seabream, Sparus aurata L., to several antibacterial agents*. J. Fish. Dis., 31: 73-76.
25. **Morris, J.G., Wilson, J.R., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Miller, A.R., Tacket, C.O., Hickman, F.W., Blake, P.A.** (1982) *Ilness caused by Vibrio damsela and Vibrio hollisae.* Lancet, 1: 1294-1297.
26. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** (2000) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*- Fifth Edition: Approved Standard M7-A5, NCCLS, Wayne, PA, USA.
27. **Rajan, P.R., Lin, J.H., Ho, M.S., Yang, H.L.** (2003) *Simple and rapid detection of Photobacterium damselae ssp. piscicida by a PCR technique and plating method*. J. Appl. Microbiol., 95: 1375-1380.
28. **Romalde, J.L.** (2002) *Photobacterium damselaedamselae subsp. piscicida: an integrated view of a bacterial fish pathogen*. Int. Microbiol., 5: 3-9.
29. **Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Nieto, T.P., Villa, T.G.** (1988) *Virulence properties and enterotoxin production of Aeromonas strains isolated from fish*. Infect. Immun., 56 (12): 3285-3293.
30. **Serracca, L., Ercolini, C., Rossini, I., Battistini, R., Giorgi, I., Prearo, M.** (2011) *Occurrence of both subspecies of Photobacterium damselae in mullets collected in the river Magra (Italy).* Can. J. Microbiol., 57 (5): 437-440.
31. **Stephens, F.J., Raidal, S.R., Buller, N., Jones, B.** (2006) *Infection with Photobacterium damselae subspecies damselae and Vibrio harveyi in snapper, Pagrus auratus with bloat*. Aust. Vet. J., 84 (5): 173-177.
32. **Tanrıkulu, T.T., Çağırgan, H.** (2011) *Doğadaki kefal balıklarında görülen pasteurellosis salgını*. Ege Üniv. Su Ürün. Derg., 18 (3/4): 509-512.
33. **Tanrikulu**, **T.T., Gultepe, N.** (2011) *Mix infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum): Lactococcus garvieae and Vibrio anguillarum O1*. J. Animal Vet. Adv., 10 (8): 1019-1023.
34. **Thyssen, A., Ollevier, F.** (2001) *In vitro antimicrobial susceptibility of Photobacterium damselae subsp. piscicida to 15 different antimicrobial agents*. Aquaculture, 200: 259-269.

35. Timur, G., Timur, M. (2003) *Balık hastalıkları*. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 5. s.538, Dilek Ofset Matbaası, İstanbul.

36. Toranzo, A., Magarinos, B., Romalde, J. (2005) *A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems.* Aquaculture, 246 (1-4): 37-61.

37. Türkiye İstatistik Kurumu. (2011) *Kültür balıkları üretim miktarı*. Erişim: http://www.tuik.gov.tr/ VeriBilgi.do?tb_id=47&ust_id=13, Erişim tarihi: 01.11.2011.

38. Zorrilla, I., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sarasquete, C., Borrego, J.J. (1999) *Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, Photobacterium damselae ssp. piscicida, from sole, Solea senegalensis (Kaup).* J. Fish Dis., 22: 167-172.

.

Yazışma Adresi:

Dr. Meriç Lütfi AVSEVER
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Bakteriyel Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı
35040 Bornova-İZMİR
E-mail: lutfiavsever@gmail.com

Bornova Vet. Bil. Derg.,
34 (48): 17-30, 2012

TAVUK ETİNDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ SIVI KROMATOGRAFİ SIRALI KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE ÇOKLU KALINTI TARAMA ANALİZİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ

METHOD DEVELOPMENT FOR THE LIKID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY MULTI RESIDUE SCREENING ANALYSIS OF RESIDUE ANTIBIOTICS IN POULTRY MEAT

Yasemin COŞKUN[1] Ahmet Turan ERDOĞDU[2] Güven ÖZDEMİR[3]
Rıdvan UYSALER[4] Ramazan ULUDAĞ[5]

Geliş Tarihi (Received): 01.10.2012 Kabul Tarihi (Accepted): 13.11.2012

ÖZET

Bu çalışmada tavuk etlerinde 4 tetrasiklin, 4 makrolid, 8 sülfonamid, 1 diaminoprimidin, 9 kinolon, 10 beta laktam ve 3 amfenikol türevi toplam 39 bileşiğin sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile belirlenmesi için yöntem geliştirilmesi ve Avrupa Birliği'nin 2002/657 sayılı direktifine göre validasyonunun yapılması amaçlandı. Bileşiklerin belirlenmesi için iki özütleme işlemi ile hazırlanan özütler, LC-MS/MS sistemine iki enjeksiyon ile verildi. Birinci özütlemede tavuk etinden antibiyotiklerin özütlenmesi, Na_2EDTA ve % 70 metanol ile gerçekleştirildi. Santrifüj ile kaba parçacıklar çöktürüldü, üst faz alınarak su ilave edildi ve filtreden geçirilerek LC-MS/MS sistemine birinci enjeksiyon yapıldı. Birinci özütleme birinci enjeksiyon ile sülfonamid, tetrasiklin, kinolon, beta laktam, makrolid ve diaminoprimidin türevi 36 bileşik 0.7–26.4 µg/kg aralığında tespit edildi. İkinci özütleme, su ve etil asetat ile gerçekleştirildi. Santrifüj ile kaba parçacıklar çöktürüldü ve üst faz alınarak kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kurumuş olan özüt, su ve n-hekzan ile çözüldü, santrifüj edildi ve alt faz, filtreden geçirilerek LC-MS/MS sistemine ikinci enjeksiyon yapıldı. İkinci özütleme ikinci enjeksiyon ile amfenikol türevi 3 bileşik 0.03–1.4 µg/kg aralığında tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Amfenikol, antibiyotik, beta laktam, diaminoprimidin, kinolon, makrolid, multi rezidü, sülfonamid, tetrasiklin.

SUMMARY

In this study, it is aimed to develop a method of multi residue screening analysis for detecting total 39 compounds (4 tetracycline, 4 macrolide, 8 sulfonamide, 1 diaminopyrimidine, 9 quinolones, 10 betalactams and 3 amphenicol derivatives) in poultry meat by likid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system and to validate that method according to European Union Directive no 2002/657/EC. In order to detect the compounds, the extractions prepared by two extract process are given into LC-MS/MS system. In the first extraction, extracting the antibiotics from poultry meat was performed by Na_2EDTA and 70 % methanol. Coarse particles were settled down by centrifugation, water was added while taking the upper phase, first injection was made into LC-MS/MS system after filtering. At the first extraction and first injection, 36 compounds of sulfonamide, tetracycline, quinolone, betalactam, macrolide and diaminopyrimidine derivatives were detected in the interval of 0.7–26.4 µg/kg. The second extraction was performed by water and ethyl acetate. Coarse particles were precipitated by centrifugation and evaporated until being dry while taking supernatant. The dried extraction was dissolved by water and n-hexan, centrifuged and second injection was made into LC-MS/MS system while filtering through lower phase. Three amphenicol derivative compounds were detected at the second extraction and second injection in the interval of 0.03–1.4 µg/kg.

Key words: Amphenicol, antibiotic, beta lactam, diaminopyrimidine, macrolide, multi residue, quinolone, sulphonamide, tetracycline.

[1] Dr. Veteriner Hekim, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
2 Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR
3 Kimyager, İzmir /Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
4 Yüksek Su Ürünleri Mühendisi, İzmir /Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
5 Bilim Uzmanı, Veteriner Hekim, Kepez İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, ANTALYA

GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusunun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenebilmesi için gerekli hayvansal besin maddelerinin ucuz ve bolca üretilebilmesi bütün ülkelerin gündeminde olan önemli konulardan biridir (12). Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi, gelişmenin hızlandırılması ve yemden yararlanmanın arttırılması, paraziter hastalıkların kontrolü ve beslenmenin desteklenmesi amacıyla çok sayıda ilaç, hormon, vitamin ve mineral madde kullanılmaktadır (8). Ülkelere göre az çok ayrım göstermekle beraber, bütün dünyada hayvancılık sektöründe kullanılan her çeşitten ilaç ve yem katkı maddesinin ortalama % 30'unu antibakteriyel ilaçların oluşturduğu ve bunların da en az % 40'ının koruyucu ve verim artırıcı amaçla kullanıldığı düşünülmektedir (12).

Besin değeri olan hayvanlarda, yasaklanmış veya tüketimine yasal olarak müsaade edilmiş antibakteriyel ilaçların, bilinçsizce ve suistimal derecesinde kullanımı sonucunda halk sağlığı açısından ciddi sakıncalar oluşturabileceği anlaşılmıştır. Özellikle gıda değeri olan hayvanlarda ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece et, süt, yumurta, bal gibi gıdalarda ilaç kalıntılarının bulunmasının önemi güncelliğini koruyacaktır (9).

Besinlerdeki ilaç ve kimyasal madde kalıntılarını ve düzeylerini ortaya koymak için son derece duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, Gıda ve Tarım Örgütü, Avrupa Birliği, Amerika Besin ve İlaç İdaresi, ülkemizde de Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı gibi önemli kuruluşlar yaptıkları çok yönlü çalışmalar ile, tüketici sağlığının korunması da dahil ilaç kalıntılarının yol açabileceği ekonomik ve sosyal yönlü olumsuzlukların önlenmesi amacıyla bir yandan veteriner ilaçların kullanımı alanında etkin bir kontrolün sağlanmasını hedeflerken, diğer yandan da tüm ülkelerde aynı konularda sürdürülen çalışma ve uygulamalar arasında birlik ve uyumun sağlanmasını düzenlemektedirler (9).

Sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi (LC-MS/MS) özgüllük ve duyarlılığı nedeniyle dünya çapında çok güçlü bir analitik cihazdır. Veteriner ilaç kalıntı analizlerinde bu tekniğin uygulanabilirliği ile ilgili kanıtlanmış birçok bilimsel makale bulunmaktadır (11). Hayvan kökenli gıdalarda antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde sıklıkla yüksek verimli bir tarama, tarama sonrası ve doğrulama yöntemi sırası izlenmektedir. Genellikle kullanılan tarama metotları mikrobiyolojik, reseptör veya immünolojik tekniklerdir. Antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem mikrobiyolojik pleyt test yöntemidir. Bu metotları gerçekleştirmek kolay ve ucuz ancak özgüllüğü eksiktir. Herhangi bir antibiyotik olmasa bile inhibisyon oluşabilir. Tarama metotlarının diğer bir olumsuzluğu ise kullanılan antikor, bakteri veya reseptörün bir veya çok az bir antibiyotik grubunu algılayabilmesidir. Bu durum tüm antibiyotik gruplarının izlenebilmesi için bir pleytte farklı pleyt testlerin kullanılmasını ya da farklı tarama testlerinin bir arada kullanılmasını gerektirmektedir. Ayrıca tarama testinden elde edilen pozitif sonuç hangi antibiyotik grubu olduğunu belirtmemektedir. Birçok durumda tarama sonrası yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir (6).

Genel olarak çalışmalarda tek bir antibiyotik grubunu hedef alarak geliştirilmiş metotlar bulunmaktadır. Test materyalinde tek özütleme işlemi ile çok sayıda antibakteriyel maddenin tespit edilmesi maliyet açısından önemlidir. Bu nedenle farklı gıda maddelerinde geniş bir yelpazede antibakteriyel ilaç kalıntılarına ait tarama analizleri için genel numune hazırlama işlemleri, azami kalıntı seviyesi (MRL) ya da izin verilen azami performans seviyesi (MRPL) altında bir seviyede yapılmalıdır. Öte yandan, materyalden gelen etkiler nedeniyle değerlendirme bazen çok zorlaşır ve sorunlar yaşanır. Sıvı kromatografi kütle spektrometresi yöntemlerinde materyalden gelen etkileri ortadan kaldırmak için aynı materyal türünden negatif olduğu bilinen materyal üzerine standart eklemesi yapılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak ya da aynı antibiyotik grubunda bulunan ancak ilaç olarak kullanılmayan bir türevi iç standart olarak kullanılarak değerlendirme yapılır (10).

Bu çalışmada birinci özütlemede tavuklarda kullanımına sınırlı olarak izin verilen ya da kullanımına izin verilmeyen 36 antibiyotik etkin maddesinin, ikinci özütlemede kullanımı yasaklanmış olan kloramfenikol ile kullanımına sınırlı olarak

izin verilen florfenikol ve tiyamfenikol olmak üzere yedi antibiyotik grubundan toplam 39 antibiyotik etkin maddesinin iki özütleme işlemi yapılarak elde edilen özütlerin LC-MS/MS sistemine iki ayrı enjeksiyon ile verilerek kalitatif analizlerinin yapılması ve Avrupa Birliği'nin 2002/657 sayılı direktifine ve Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı'nın 20.01.2010 tarihli kurallarına göre validasyonunun yapılması amaçlanmıştır (1, 2).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Materyal olarak İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne önceden gelen ve LC-MS/MS sisteminde analiz edilerek sonucu negatif olarak değerlendirilen tavuk etleri kullanıldı.

Metot

Kullanılan Ekipman

Sıralı kütle spektrometresi 6460 serisi (Agilent), 1200 serisi sıvı kromatografi (Agilent), 1200 serisi pompa (Agilent), 1200 serisi degazer (Agilent), 1200 serisi otomatik örnekleyici (Agilent), 3,5µ, 100 mm x 4,6 mm ebadında kolon (Zorbax SB-C18).

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanmaları

Referans Standartlar ve Kimyasal Maddeler

Oksitetrasiklin hidroklorür, (Riedel De Haen, 46598, % 98.1 saflıkta), tetrasiklin hidroklorür (Fluka, 31741, % 97.7), klortetrasiklin hidroklorür (Riedel De Haen, 46133, % 90.0 saflıkta), doksisiklin hiklat (Fluka, 33429, % 98.2 saflıkta), demeklosiklin hidroklorür (Sigma Aldrich, D6140, % 98.0 saflıkta), eritromisin A dihidrat (Fluka 46256, % 95.5 saflıkta), spiramisin (Fluka 46745, % 88.9 saflıkta), tilmikosin (Fluka, 33864, % 86.5 saflıkta), tilosin tartarat (Fluka, 33847, % 84.6 saflıkta), roksitromisin (Sigma-Aldrich, 100926109, % 98.3 saflıkta), sülfadiazin (Fluka, 35033, % 99.7 saflıkta), sülfatiazol (Fluka, 46902, % 99.9 saflıkta), sülfamerazin (Fluka, 46826, % 99.9 saflıkta), sülfamethazin-fenil-13C6 hemihidrat (Fluka, 32519, % 99.9 saflıkta), sülfametaksazol (Fluka, 31737, % 99.9 saflıkta), sülfadimetoksin (Fluka, 46794, % 99.8 saflıkta), sülfakloropridazin (Fluka, 46778, % 99.4 saflıkta), sülfakinoksalin (Fluka, 45662, % 96 saflıkta), trimetoprim (Fluka, 46984, % 99.5 saflıkta), sülfapiridin (Fluka,31738, % 99.7 saflıkta), enrofloksasin (Riedel De Haen, 33699, % 99.6 saflıkta), siprofloksasin (Fluka, 33434, % 99.6 saflıkta), danofloksasin (Fluka, 33700, % 99.8 saflıkta), sarafloksasin (Fluka, 33497, % 97.3 saflıkta), marbofloksasin (Fluka, 34039, % 98.9 saflıkta), difloksasin (Fluka, 33984, % 98.4 saflıkta), flumekuin (Fluka, 45735, % 99.4 saflıkta), norfloksasin (Fluka, 33899, % 99.8 saflıkta), oksolinik asit (Sigma, 0877, % 99 saflıkta), nalidiksik asit (Bio chemika, 70126, % 95 saflıkta), amoksisilin trihidrat (Riedel de Haen 46060 % 98.7 saflıkta), ampisilin sodyum (Applichem A 0839,0025 % 99 saflıkta), penisilin G potasyum (Riedel de Haen, 46609, % 99.4 saflıkta), oksasilin sodyum hidrat (Riedel de Haen, 46589, % 99.5 saflıkta), kloksasilin sodyum hidrat (Riedel de Haen, 46140, % 98.6 saflıkta), dikloksasilin sodyum hidrat (Riedel de Haen, 46182, % 97.1 saflıkta), nafsilin sodyum monohidrat (Sigma, N3269-5G, 921mg/g), sefaleksin (Riedel de Haen, 33989, % 99.9 saflıkta), seftiofur (Riedel-de Haen, 34001, % 99 saflıkta), sefapirin (Fluka, 43989, % 98 saflıkta), kloramfenikol (Riedel de Haen, 46110 % 99.8 saflıkta), tiamfenikol (Sigma, T0261, % 98 saflıkta), florfenikol (Sigma, F1427, % 100 saflıkta), kloramfenikol -d5 (Fluka, 41724, % 97 saflıkta), penisilin-V (Dr. Ehrenstorfer, C15935010), analitik saflıkta metanol, formik asit, asetonitril, okzalik asit dihidrat, tritripleks Na_2EDTA, etilasetat, n-hekzan, su.

Çözeltilerin Hazırlanması

Özütleme–1 Çözeltileri:

Mobil Faz A: Hacmi 1 litre olan balon jojeye 0.126 g okzalik asit konularak yaklaşık 500 ml su ile çözüldü. İçerisine 2 ml formik asit ilave edilerek hacmi 1 litreye tamamlandı. Ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletildi.

Mobil Faz B: Hacmi 1 litre olan balon joje içerisine 900 ml asetonitril konuldu, 1 ml formik asit ilave edilerek hacmi 1 litreye tamamlandı.

Na_2EDTA, 0.1 M: Hacmi 100 ml olan balon joje içerisine 3.72 g Na_2EDTA konularak bir mik-

tar saf suda çözüldü ve saf su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Antibiyotik Standartlarının Ana Stok Çözeltileri (500 mg/L): Toz standartlardan 10 mg saf standarda karşılık gelecek miktarda tartım yapıldı ve her biri 20 ml uygun çözücü ile çözüldü. Tetrasiklinler ve makrolitler için metanol; sülfonamidlerden sülfadiazin için aseton, sülfakloropridazin için metanol, diğer sülfonamid bileşikleri için asetonitril; kinolonlar için 40mM NaOH içeren metanol, beta laktamlardan amoksisilin ve seftiofur için % 50 asetonitril, diğerleri için ise su uygun çözücüdür.

Antibiyotik Standart Çalışma Çözeltisi: Hacmi 50 ml olan amber renkli balon jojeye Tablo 1'de belirtilen miktarlarda ana stok çözeltilerinden alındı ve % 25'lik asetonitril ile hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

İç Standart Ana Stok Çözeltileri (500 mg/L): Toz standartlardan 10 mg saf standarda karşılık gelecek miktarda tartım yapıldı ve 20 ml uygun çözücüde çözüldü. Demeklosiklin ve roksitromisin için metanol; sülfapridin için asetonitril; norfloksasin için 40mM NaOH içeren metanol, penicilin-V için su uygun çözücüdür.

İç Standart Çalışma Çözeltileri: Hacmi 50 ml olan amber renkli balon jojeye 0.2 ml (2 mg/L) demeklosiklin, 0.1 ml (1 mg/L) roksitromisin, 0.2 ml (2 mg/L) sülfapridin, 1 ml (10 mg/L) norfloksasin, 1 ml (10 mg/L) penisilin-V ana stok çözeltilerinden alındı ve % 25 asetonitril ile 50 ml'ye tamamlandı.

Özütleme–2 Çözeltileri:

Mobil Faz A: Ultra saf su

Mobil Faz B: Metanol

Antibiyotik Standartlarının Ana Stok Çözeltileri (1000 mg/L): Kloramfenikol, tiyamfenikol ve florfenikol toz standartlarından 10 mg saf standarda karşılık gelecek miktarda tartım yapıldı ve 10 ml metanol ile çözüldü.

Antibiyotik Standart Çalışma Çözeltisi: Kloramfenikol ana stok standardı su ile seyreltilerek 10 µg/L, tiyamfenikol ve florfenikol ana stok standartları su ile seyreltilerek 1 mg/L çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler karışım halinde kullanıldı.

İç Standart Çözeltisi: D5 kloramfenikol toz standardından 10 mg saf standarda karşılık gelecek miktarda tartım yapıldı ve 10 ml metanol ile çözüldü. Su ile seyreltilerek 50 µg/L çalışma çözeltileri hazırlandı.

Tablo 1. Antibiyotik Standart Çalışma Çözeltisi Hazırlanmasında Ana Stok Çözeltilerinden Alınacak Miktarlar ve Hazırlanacak Çözeltideki Yoğunlukları.

Standart	Alınacak Miktar (µl)	Son Yoğunluk (mg/L)	Standart	Alınacak Miktar (µl)	Son Yoğunluk (mg/L)
Oksitetrasiklin	200	2	Eritromisin	100	1
Tetrasiklin	200	2	Spiramisin	400	4
Klortetrasiklin	200	2	Tilosin	100	1
Doksisiklin	200	2	Tilmikosin	150	1.5
Sülfadiyazin	100	1	Enrofloksasin	100	1
Sülfatiyazol	100	1	Ciprofloksasin	100	1
Sülfamerazin	100	1	Oksolinik asit	100	1
Sülfametazin	100	1	Flumekuin	100	1
Sülfametoksazol	100	1	Danofloksasin	200	2
Sülfadimetoksin	100	1	Difloksasin	100	1
Sülfakloropridazin	100	1	Sarafloksasin	200	2
Sulfakinoksalin	100	1	Marbofloksasin	100	1
Amoksisilin	100	1	Nalidiksik asit	100	1
Ampisilin	100	1	Trimetoprim	100	1
Penisilin-G	100	1	Nafsilin	200	2
Oksasilin	600	6	Seftiofur	200	2
Kloksasilin	600	6	Sefaprin	100	1
Dikloksasilin	600	6	Sefaleksin	200	2

Özütleme İşlemleri

Özütleme–1 İşlemi: Tetrasiklin, sülfonamid, makrolid, kinolon, diaminoprimidin ve beta laktam türevi antibiyotiklerin tespiti için kullanılan özütleme yöntemidir. Homojen hale getirilen materyal 50 ml'lik polipropilen santrifüj tüpüne 2.0±0.01 g tartıldı. İç standart çalışma çözeltisinden 100'er µl yükleme yapıldı ve birkaç saniye vorteks ile karıştırıldı. Üzerine 200 µl 0.1 M Na_2EDTA ve 10 ml % 70'lik metanol eklendi. Vorteks ile 15 dakika karıştırılarak, 18 dakika 3°C'de 4000 devirde santrifüj edildi. Üst fazdan 0.5 ml alınarak temiz bir cam tüpe aktarıldı. Üzerine 2 ml su eklenerek 2 dakika vorteks ile karıştırıldı. Özüt 0.45 µm filtreden geçirilerek otomatik örnekleyici şişesine alındı ve LC-MS/MS sistemine 20 µl enjekte edildi.

Kalibrasyon Eğrisi Oluşturmak İçin Hazırlanan Standart İlave Edilmiş Kas Doku Materyalinin Özütlenmesi: Hacmi 50 ml olan 2 ayrı polipropilen santrifüj tüpüne 2 ± 0.02 g tavuk eti tartıldı. Tüplere sırası ile 50 ve 100 µl çalışma standart çözeltisi eklendi. Bir kaç saniye vorteks ile karıştırıldı. Özütleme işlemlerine aynı şekilde devam edildi.

Özütleme–2 İşlemi: Amfenikol türevi antibiyotiklerin tespiti için kullanılan özütleme yöntemidir. Homojen hale getirilen tavuk eti 50 ml'lik polipropilen santrifüj tüpüne 3.0±0.01 g tartıldı. Üzerine 3 ml su ve 6 ml etilasetat eklendi. 15 dakika vorteks ile karıştırıldı, 15 dakika 4°C'de 4000 devirde santrifüj edildi. Üst fazdan 3 ml cam tüpe alınarak, 50°C'de azot gazı ile kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kurumuş olan özütün üzerine 1.5 ml su ve 3 ml n-hekzan eklenerek 15 dakika vorteks ile çözüldü. Santrifüj işlemi 4°C'de 4000 devirde 15 dakika uygulandı. Alt fazdan 1 ml alınarak 0.45 µm filtreden geçirildi. Otomatik örnekleyici şişesine alınarak LC-MS/MS sistemine 25 µl enjekte edildi.

Kalibrasyon Eğrisi Oluşturmak İçin Hazırlanan Standart Yüklenmiş Kas Doku Materyalinin Özütlenmesi: Hacmi 50 ml olan 2 ayrı polipropilen santrifüj tüpüne 2 ± 0.02 g tavuk eti tartıldı. Tüplere sırası ile 50 ve 100 µl çalışma standart çözeltisi eklendi. Birkaç saniye vorteks ile karıştırıldı. Özütleme işlemlerine aynı şekilde devam edildi.

Cihaz Koşulları

Özütleme–1 / Enjeksiyon–1

Pompa Koşulları

Akış Hızı: 0.8 ml/dakika

Azami Basınç: 300 bar

Kolon Fırını Sıcaklığı: 35°C

Pompa Oranlama Programı: Tablo 2'de gösterilmiştir.

İyon Kaynağı

Gaz ve Taşıyıcı Gaz: Azot

Gaz Sıcaklığı: 350°C

Gaz Akış Hızı: 10 L/dakika

Nebuliser Basıncı: 45 psi

Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı: 400°C

Taşıyıcı Gaz Akış Hızı: 12 L/dakika

Capillary: 4000 volt

Polarite: Pozitif

MS/MS Koşulları: Tablo 3-1'de LC-MS/MS zaman basamakları ve Tablo 3-2'de bileşiklere ait LC-MS/MS koşulları verilmiştir.

Tablo 2. Özütleme –1/Enjeksiyon–1'in Pompa Oranlama Programı.

Basamak	Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
1	00.00	90	10
2	01.00	90	10
3	08.00	10	90
4	10.00	10	90

Tablo 3-1. Özütleme –1/Enjeksiyon–1'in LC-MS/MS Zaman Basamakları.

Zaman Basamağı	Zaman Tarama Tipi	İyonizasyon Modu	Valf Dönüş Yönü	Delta Elektronmilivolt (+)	Kaydetme	Serinin Tarandığı Süre
1	1.9 uncu dakikada Dinamik MRM	ESI+Agilent Jet Stream	MS	400 milivolt	+	400 milisaniye

Tablo 3-2. Özütleme –1/Enjeksiyon–1'in Bileşiklere Ait LC-MS/MS Koşulları.

Bileşik	Birinci İyon	Birinci Kütle Spektrometre-sinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Parçalanma İyonu	İkinci Kütle Spektrometre-sinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Fragment (Volt)	Çarpışma Enerjisi (Volt)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Alıkonulma Zaman Aralığı (dakika)
Klortetrasiklin	479	Wide	444	Wide	70	20	6.46	1.4
Klortetrasiklin	479	Wide	154	Wide	70	25	6.46	1.4
Oksitetrasiklin	461	Wide	444	Wide	70	10	4.92	1.4
Oksitetrasiklin	461	Wide	426	Wide	70	15	4.92	1.4
Doksisiklin	445	Wide	428	Wide	70	15	6.75	1.4
Doksisiklin	445	Wide	410	Wide	70	25	6.75	1.4
Tetrasiklin	445	Wide	410	Wide	80	15	5.32	1.4
Tetrasiklin	445	Wide	154	Wide	80	25	5.32	1.4
Demeklosiklin*	465	Wide	448	Wide	70	10	5.86	1.4
Eritromisin	734.4	Wide	576.4	Wide	100	15	7.85	1.4
Eritromisin	734.4	Wide	158.1	Wide	100	30	7.85	1.4
Spiramisin	843.5	Wide	540.4	Wide	60	30	6	1.4
Spiramisin	843.5	Wide	174.1	Wide	60	35	6	1.4
Tilmikosin	869.5	Wide	174	Wide	100	50	6.93	1.4
Tilmikosin	869.5	Wide	156	Wide	100	50	6.93	1.4
Tilosin	916.5	Wide	772.2	Wide	100	30	8.19	1.4
Tilosin	916.5	Wide	174.1	Wide	100	40	8.19	1.4
Roksitromisin*	837.5	Wide	158.1	Wide	140	35	9.32	1.4
Sülfadimetoksin	311	Wide	156	Wide	80	15	7.98	1.4
Sülfadimetoksin	311	Wide	92	Wide	80	30	7.98	1.4
Sülfametazin	279	Wide	186	Wide	80	10	5.47	1.4
Sülfametazin	279	Wide	156	Wide	80	15	5.47	1.4
Sülfamerazin	265	Wide	156	Wide	80	10	4.93	1.4
Sülfamerazin	265	Wide	92	Wide	80	25	4.93	1.4
Sülfatiyazol	256	Wide	156	Wide	80	10	4.45	1.4
Sülfatiyazol	256	Wide	92	Wide	80	25	4.45	1.4
Sülfametoksazol	254	Wide	156	Wide	80	10	7	1.4
Sülfametoksazol	254	Wide	92	Wide	80	25	7	1.4
Sülfadiyazin	251	Wide	156	Wide	80	10	4.18	1.4
Sülfadiyazin	251	Wide	92	Wide	80	25	4.18	1.4
Sülfakloropridazin	285	Wide	156	Wide	100	10	6.7	1.4
Sülfakloropridazin	285	Wide	108	Wide	100	25	6.7	1.4
Sulfakinoksalin	301	Wide	156	Wide	100	10	8.05	1.4
Sulfakinoksalin	301	Wide	108	Wide	100	10	8.05	1.4
Sülfapridin*	250	Wide	108	Wide	80	20	4.57	1.4
Trimetoprim	291.1	Wide	230	Wide	100	20	4.8	1.4
Trimetoprim	291.1	Wide	123	Wide	100	25	4.8	1.4
Marbofloksasin	363	Wide	320	Wide	70	10	4.74	1.4
Marbofloksasin	363	Wide	72	Wide	70	20	4.74	1.4
Norfloksasin*	320	Wide	276	Wide	60	10	4.89	1.4
Enrofloksasin	360	Wide	316	Wide	70	15	5.41	1.4
Enrofloksasin	360	Wide	245	Wide	70	25	5.41	1.4
Danofloksasin	358	Wide	314	Wide	60	15	5.23	1.4
Danofloksasin	358	Wide	96	Wide	60	20	5.23	1.4
Siprofloksasin	332	Wide	314	Wide	60	15	5.05	1.4
Siprofloksasin	332	Wide	288	Wide	60	15	5.05	1.4
Flumekuin	262	Wide	244	Wide	80	15	9.24	1.4
Flumekuin	262	Wide	202	Wide	80	30	9.24	1.4
Oksolinik asit	262	Wide	244	Wide	80	10	7.57	1.4
Oksolinik asit	262	Wide	216	Wide	80	25	7.57	1.4
Nalidiksik asit	233	Wide	215	Wide	80	10	9.05	1.4
Nalidiksik asit	233	Wide	187	Wide	80	20	9.05	1.4

Tablo 3-2. Devamı

Bileşik	Birinci İyon	Birinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Parçalanma İyonu	İkinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Fragment (Volt)	Çarpışma Enerjisi (Volt)	Alıkonulma Süresi (dakika)	Alıkonulma Zaman Aralığı (dakika)
Difloksasin	400	Wide	356	Wide	70	15	6.08	1.4
Difloksasin	400	Wide	299	Wide	70	35	6.08	1.4
Sarafloksasin	386	Wide	342	Wide	80	10	5.98	1.4
Sarafloksasin	386	Wide	299	Wide	80	25	5.98	1.4
Amoksisilin	366	Wide	349	Wide	80	3	2.57	1.4
Amoksisilin	366	Wide	114	Wide	80	15	2.57	1.4
Ampisilin	350	Wide	160	Wide	100	5	4.64	1.4
Ampisilin	350	Wide	106	Wide	100	15	4.64	1.4
Penisilin-G	335	Wide	176	Wide	80	10	8.51	1.4
Penisilin-G	335	Wide	160	Wide	80	5	8.51	1.4
Oksasilin	402	Wide	243	Wide	80	10	9.65	1.4
Oksasilin	402	Wide	160	Wide	80	5	9.65	1.4
Kloksasilin	436	Wide	277	Wide	100	10	10.19	1.4
Kloksasilin	436	Wide	160	Wide	100	10	10.19	1.4
Dikloksasilin	470	Wide	160	Wide	100	10	10.97	1.4
Dikloksasilin	470	Wide	311	Wide	100	10	10.97	1.4
Nafsilin	415	Wide	256	Wide	100	10	10.47	1.4
Nafsilin	415	Wide	199	Wide	100	10	10.47	1.4
Sefaleksin	348	Wide	174	Wide	80	10	4.71	1.4
Sefaleksin	348	Wide	158	Wide	80	3	4.71	1.4
Seftiofur	524	Wide	241	Wide	120	15	7.25	1.4
Seftiofur	524	Wide	210	Wide	120	20	7.25	1.4
Sefapirin	424	Wide	292	Wide	100	10	3.72	1.4
Sefapirin	424	Wide	152	Wide	100	20	3.72	1.4
Penisilin- V*	351	Wide	160	Wide	80	5	9.25	1.4
Penisilin- V*	351	Wide	114	Wide	80	30	9.25	1.4

* İç standart olarak kullanılmıştır.

Cihaz Yıkama Koşulları**:** Her seri işlem bitiminden sonra sistem sıra ile 15 dakika metanol, 15 dakika su, 15 dakika asetonitril, 15 dakika % 65 asetonitril ile yıkandı.

Özütleme –2 / Enjeksiyon–2

Pompa Koşulları

Akış Hızı: 0.7 ml/dakika

Azami Basınç: 250 bar

Kolon Fırını Sıcaklığı: 35°C

Pompa Oranlama Programı: Tablo 4'te verilmiştir.

İyon Kaynağı

Gaz Sıcaklığı: 300°C

Gaz Akış Hızı: 9 L/dakika

Nebuliser Basıncı: 45 psi

Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı: 350°C

Taşıyıcı Gaz Akış Hızı: 11 L/dakika

Capillary: 3500 volt

Polarite: Negatif

MS/MS Koşulları**:** Tablo 5.1'de LC-MS/MS zaman basamakları, Tablo 5.2'de tiyamfenikole ait LC-MS/MS koşulları, Tablo 5.3'de florfenikole ait LC-MS/MS koşulları ve Tablo 5.4'te kloramfenikole ait LC-MS/MS koşulları verilmiştir.

Tablo 4. Özütleme –2/Enjeksiyon–2'nin Pompa Oranlama Programı.

Basamak	Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
1	0.00	75	25
2	7.00	30	70
3	7.10	10	90
4	9.00	10	90
5	9.10	75	25
6	14.00	75	25

Tablo 5.1. Özütleme –2 / Enjeksiyon–2'in LC-MS/MS Zaman Basamakları.

Sıra	Tespit Edilen Bileşik	Başlama Zamanı (dakika)	Tarama Tipi	Valf Dönüş Yönü	Delta Elektronmilivolt (-)	Kaydetme
1	-	0.0	MRM	Atık	0	-
2	Tiyamfenikol	2.0	MRM	MS	200 milivolt	+
3	Florfenikol	5.0	MRM	MS	100 milivolt	+
4	Kloramfenikol	6.2	MRM	MS	300 milivolt	+
5	-	8.0	MRM	Atık	0	-

Tablo 5.2. Özütleme –2 / Enjeksiyon–2'nin Tiyamfenikole Ait LC-MS/MS Koşulları.

Bileşik	Birinci İyon	Birinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Parçalanma İyonu	İkinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Tarama Zamanı (milisaniye)	Fragment (Volt)	Çarpışma Enerjisi (Volt)
Tiyamfenikol	354	Wide	290	Wide	50	100	10
Tiyamfenikol	354	Wide	185	Wide	50	100	15

Tablo 5.3. Özütleme –2 / Enjeksiyon–2'nin Florfenikole Ait LC-MS/MS Koşulları.

Bileşik	Birinci İyon	Birinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Parçalanma İyonu	İkinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Tarama Zamanı (milisaniye)	Fragment (Volt)	Çarpışma Enerjisi (Volt)
Florfenikol	356	Wide	336	Wide	50	100	10
Florfenikol	356	Wide	185	Wide	50	100	10

Tablo 5.4. Özütleme –2 / Enjeksiyon–2'nin Kloramfenikole Ait LC-MS/MS Koşulları.

Bileşik	Birinci İyon	Birinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Parçalanma İyonu	İkinci Kütle Spektrometresinde İyon Kütle Aralığı (±0.3 m/z)	Tarama Zamanı (milisaniye)	Fragment (Volt)	Çarpışma Enerjisi (Volt)
Kloramfenikol	321	Wide	257	Wide	50	100	5
Kloramfenikol	321	Wide	152	Wide	50	100	15
D5 Kloramfenikol*	325	Wide	157	Wide	50	100	15

* İç standart olarak kullanılmıştır.

Cihaz Yıkama Koşulları: Her seri işlem bitiminden sonra sistem 2 ml/dakika akış hızında 5 dakika % 50 asetonitril ile daha sonra 5 dakika % 90 asetonitril ile yıkandı.

Validasyon İşlemleri

Metot validasyon çalışmalarında Avrupa Birliği'nin 2002/657 sayılı direktifi ve Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı'nın 20.01.2010 tarihli kuralları uygulandı (1, 5). Tarama analizi metot validasyonu için 20 farklı negatif materyal ve azami kalıntı seviyesinin yarısı seviyesinde standart ilave edilmiş 20 materyal analiz edildi. Aynı kişi farklı 20 negatif ve 20 standart ilave edilmiş numuneyi farklı günde analiz etti. Farklı kişi farklı 20 negatif ve 20 standart ilave edilmiş numuneyi farklı günde analiz etti.

Özgüllük / Seçicilik

Negatif olduğu bilinen 20 farklı tavuk eti analiz edildi. Yanlış pozitif oranı ölçülerek özgüllük belirlendi. Aynı tavuk etleri üzerine metodun tespit edebileceği en fazla azami kalıntı seviyesinin 0.5 katı seviyesinde standart yüklenerek analiz edildi ve seçicilik belirlendi.

Tayin Kapasitesi (CCß)

Negatif olduğu bilinen 20 farklı tavuk eti üzerine metodun tespit edebileceği en fazla azami kalıntı seviyesinin 0.5 katı seviyesinde standart yüklenerek analiz edildi. Seçicilik ve tayin kapasitesi aynı analiz sonuçlarından hesaplandı.

Tespit Limiti (LOD)

Negatif 20 tavuk etinin LC-MS/MS sisteminde analizinden elde edilen gürültü seviyeleri her bileşik için ayrı hesaplandı. Negatif numunelere hesaplanan yoğunluklarda standart ilave edilerek kontrol edildi. Bileşiklerin gürültü seviyesi standartların alıkonulma zamanının % 5 aralığında belirlendi. Her bileşik için elde edilen 20 gürültü sonucunun ortalamasının 3 katına karşılık gelen miktar hesaplandı. Standart ilave edilmiş 20 numuneden elde edilen piklerden elde edilen miktar ve ilave edilen standardın miktarı tespit limiti hesaplamasında kullanıldı. Bu miktar hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

LOD=3x[C/(S/N)]

S: Standart yüklemesi yapılan 20 tavuk etinden elde edilen pik yüksekliği ortalaması

N: Negatif 20 materyalden elde edilen gürültünün ortalaması

C: İlave edilen standardın yoğunluğu

Tespit limiti hesaplamasında her bileşiğin iki farklı geçişi için hesaplama yapıldı. Bir bileşiğin miktarsal analiz piki cihaz cevabı büyük olan geçişe ait piktir. Doğrulama piki ise cihaz cevabı küçük olan geçişin varlığının tespit edilmesi ve bu geçişler arasındaki yüzde oranının standart enjeksiyonu ile belirlenmiş olan orana uymasıdır. İkinci geçişin birinci geçişin yüzde kaçı olduğunu belirlemek için cihaza antibiyotik standart çalışma çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılarak bileşiklerin geçişler arasındaki oranı belirlendi. Standart ilave edilen tavuk etlerinin enjeksiyonlarından bileşiklere ait oranlar belirlendi ve standart enjeksiyonu oranları ile karşılaştırıldı.

Kesme Değeri (Fm) Hesaplaması: Standart ilave edilmiş tavuk etlerinin pik yüksekliklerinin ortalamasından standart ilave edilmiş tavuk etlerinden elde edilen pik yüksekliklerinin 1.64 katının çıkarılmasıyla elde edilen değerdir.

Eşik Değeri (T) Hesaplaması: Negatif tavuk etlerinin pik yüksekliklerinin ortalamasından negatif tavuk etlerinden elde edilen pik yüksekliklerinin 1.64 katının toplanmasıyla elde edilen değerlerdir.

Tayin kapasitesinin (ccβ) azami kalıntı seviyesine eşit veya küçük olması ancak kesme değerinin (Fm) eşik değerinden (T) büyük olması ile sağlanır.

BULGULAR

Bu çalışmada iki özütleme işlemi ile elde edilen özütlerin LC-MS/MS cihazına iki enjeksiyon ile verilmesiyle toplam 39 antibiyotik bileşiği tespit edildi. Birinci özütleme birinci enjeksiyonda LC-MS/MS cihazında pozitif iyon modunda çalışılmış olup 4 tetrasiklin, 4 makrolid, 8 sülfonamid, 1 diaminoprimidin, 9 kinolon ve 10 beta laktam türevi toplam 36 bileşik tespit edildi. İkinci özütleme ikinci enjeksiyon ile ise LC-MS/MS cihazında negatif iyon modunda çalışılmış olup amfenikol grubunda bulunan 3 bileşik tespit edildi. Tüm bileşiklere ait validasyon sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

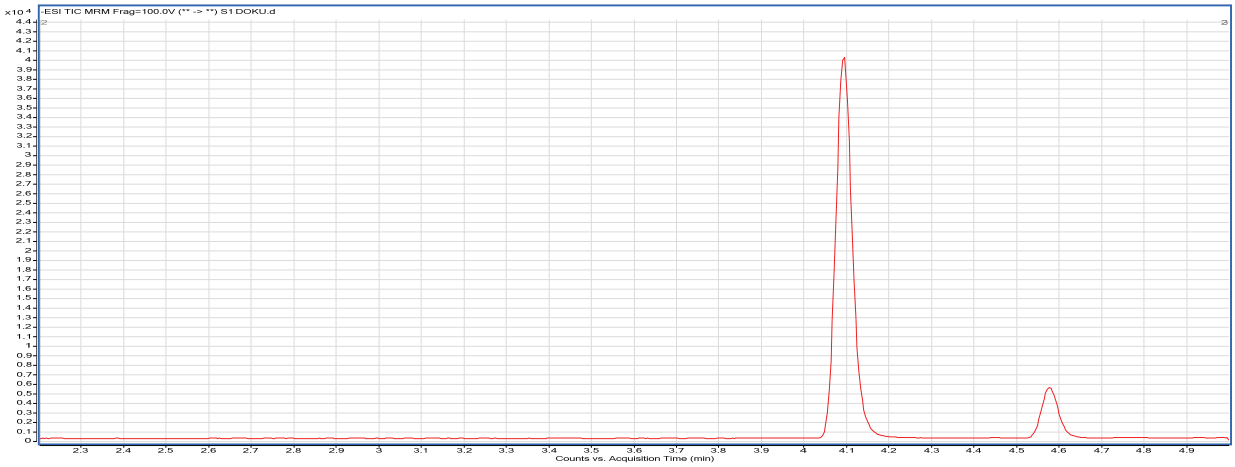
Tablo 6. Bileşiklere Ait Azami Kalıntı Seviyeleri (AKS), Birinci ve İkinci Geçişte Tayin Kapasitesi (CCβ), Tespit Limiti (LOD), Özgüllük, Seçicilik Değerleri ve Kesme Değeri (Fm)/ Eşik Değeri Oranları.

GRUP	BİLEŞİK	AKS	BIRINCI GECIS					IKINCI GECIS				
			Fm/T/B	CCβ (ug/kg)	LOD (ug/kg)	Özgüllük (%)	Seçicilik (%)	Fm/T/B	CCβ (ug/kg)	LOD (ug/kg)	Özgüllük (%)	Seçicilik (%)
SÜLFONAMİD	Sülfadiyazin	100	Fm>T	<25	2	100	100	Fm>T	<25	2.4	100	100
	Sülfatiyazol		Fm>T	<25	1.7	100	100	Fm>T	<25	2.4	100	100
	Sülfamerazin		Fm>T	<25	0.9	100	100	Fm>T	<25	1.2	100	100
	Sülfametazin		Fm>T	<25	0.5	100	100	Fm>T	<25	1.2	100	100
	Sülfametoksazol		Fm>T	<25	1.6	100	97.6	Fm>T	<25	1.9	100	100
	Sülfadimetoksin		Fm>T	<25	0.7	100	100	Fm>T	<25	0.9	100	100
	Sülfakloropridazin		Fm>T	<25	3.9	100	100	Fm>T	<25	6.6	100	100
	Sulfakinoksalin		Fm>T	<25	2.2	100	100	Fm>T	<25	6.9	100	100
DİAMİNO PRİMİDİN	Trimetoprim	50	Fm>T	<25	0.5	100	100	Fm>T	<25	1.7	100	100
TETRASİKLİN	Oksitetrasiklin	100	Fm>T	<50	0.8	92	100	Fm>T	<50	4.4	100	100
	Tetrasiklin	100	Fm>T	<50	0.3	100	100	Fm>T	<50	0.8	100	100
	Klortetrasiklin	100	Fm>T	<50	1.3	96	100	Fm>T	<50	2.4	100	100
	Doksisiklin	100	Fm>T	<50	8.8	96	97.7	Fm>T	<50	12.2	96	97.7
MAKRDOLİD	Eritromisin	200	Fm>T	<25	2.8	100	100	Fm>T	<25	2.3	100	100
	Spiramisin	200	Fm>T	<100	2.7	100	100	Fm>T	<100	13.7	100	97.7
	Tilosin	100	Fm>T	<25	0.9	100	100	Fm>T	<25	3	100	100
	Tilmikosin	75	Fm>T	<37.5	1.3	96	97.7	Fm>T	<37,5	5.6	96	97.7
KİNOLON	Enrofloksasin	100	Fm>T	<50	3.2	100	100	Fm>T	<50	3.6	100	97.7
	Siprofloksasin		Fm>T	<50	0.4	100	100	Fm>T	<50	6.6	100	97.7
	Oksolinik asit	100	Fm>T	<50	1.4	100	100	Fm>T	<50	2.3	100	100
	Flumekuin	400	Fm>T	<100	0.6	100	100	Fm>T	<100	0.7	100	100
	Danofloksasin	200	Fm>T	<100	7.9	100	97.7	Fm>T	<100	12	100	100
	Difloksasin	300	Fm>T	<200	1.1	100	97.6	Fm>T	<200	1.6	100	97.6
	Sarafloksasin	*	Fm>T	<50	6.6	100	100	Fm>T	<50	5.6	100	100
	Marbofloksasin	*	Fm>T	<75	2	100	100	Fm>T	<75	1.9	100	100
	Nalidiksik asit	*	Fm>T	<50	0.7	100	100	Fm>T	<50	0.7	100	100
BETA LAKTAM	Amoksisilin	50	Fm>T	<25	9.2	100	100	Fm>T	<25	4.9	100	100
	Ampisilin	50	Fm>T	<25	1.1	100	97.7	Fm>T	<25	3.7	100	100
	Penisilin-G	50	Fm>T	<25	5.8	100	95.5	Fm>T	<25	7.6	100	97.7
	Oksasilin	300	Fm>T	<150	3.8	100	97.7	Fm>T	<150	7.1	100	100
	Kloksasilin	300	Fm>T	<150	10.7	100	100	Fm>T	<150	9	100	100
	Dikloksasilin	300	Fm>T	<150	16.7	100	100	Fm>T	<150	26.4	100	100
	Nafsilin	*	Fm>T	<25	0.5	100	100	Fm>T	<25	4.1	100	100
	Seftiofur	*	Fm>T	<25	7.6	100	100	Fm>T	<25	11.9	100	100
	Sefapirin	*	Fm>T	<25	0.9	96	100	Fm>T	<25	1.1	100	100
	Sefaleksin	*	Fm>T	<25	2.6	100	95.5	Fm>T	<25	4.7	100	95.5
AMFENİKOL	Kloramfenikol	**	Fm>T	<5	0.2	100	100	Fm>T	<5	1.4	100	100
	Florfenikol	100	Fm>T	<5	0.03	100	100	Fm>T	<5	0.1	95	100
	Tiyamfenikol	50	Fm>T	<0.2	0.04	100	100	Fm>T	<0.2	0.03	100	100

*Kanatlı kas dokusunda bulunmaması gereken bileşikler (2).

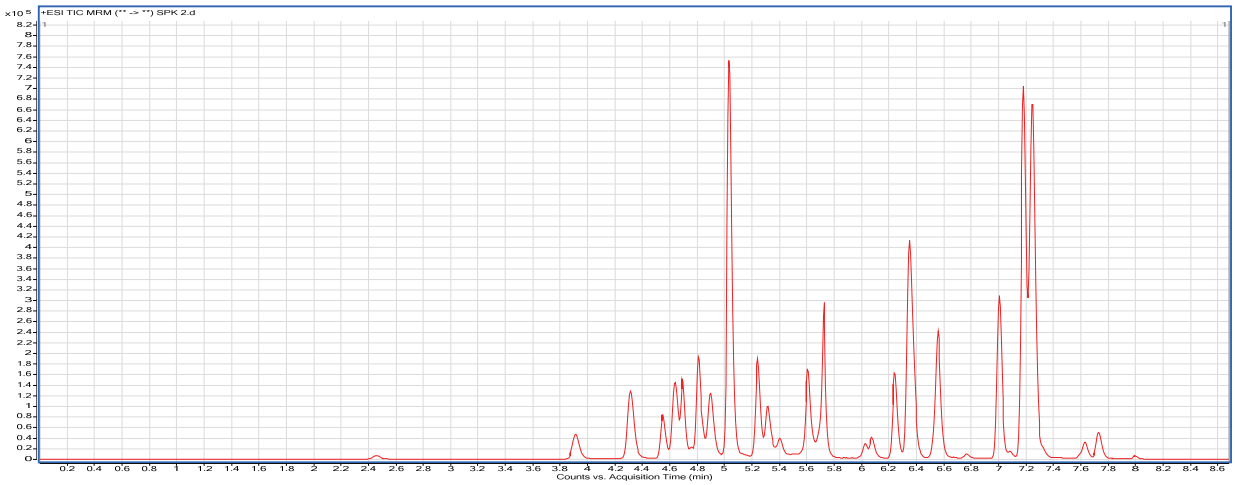
**Kloramfenikol gıda değeri olan hayvanlarda kullanılması yasak olan antibiyotiktir (2). MRPL 0.3 olarak belirlenmiştir.

Şekil 1'de negatif numune kromatogramı gösterilmiştir.



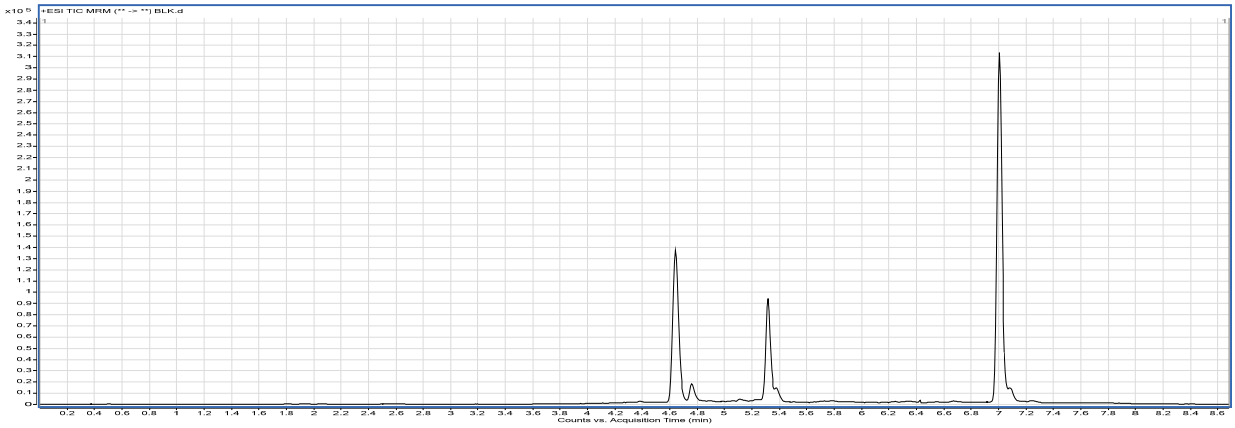
Şekil 1. Negatif numune kromatogramı.

Şekil 2'de negatif olduğu bilinen tavuk eti üzerine özütleme-1'e ait standartların eklenmesi ile elde edilen kromatogram gösterilmiştir.



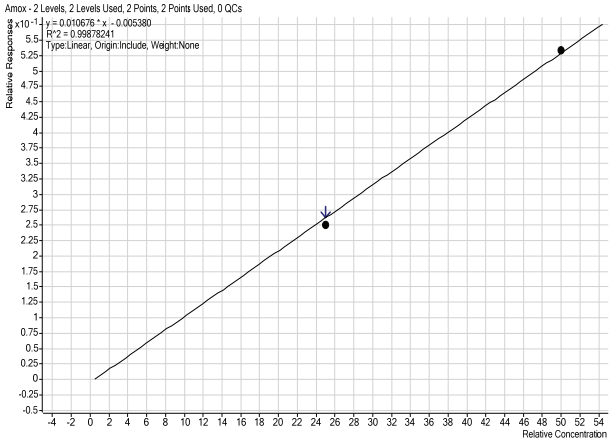
Şekil 2. Negatif olduğu bilinen tavuk eti üzerine özütleme-1'e ait standartların eklenmesi ile elde edilen kromatogram.

Şekil 3'de negatif olduğu bilinen tavuk eti üzerine özütleme-2'ye ait standartların eklenmesi ile elde edilen kromatogram gösterilmiştir.

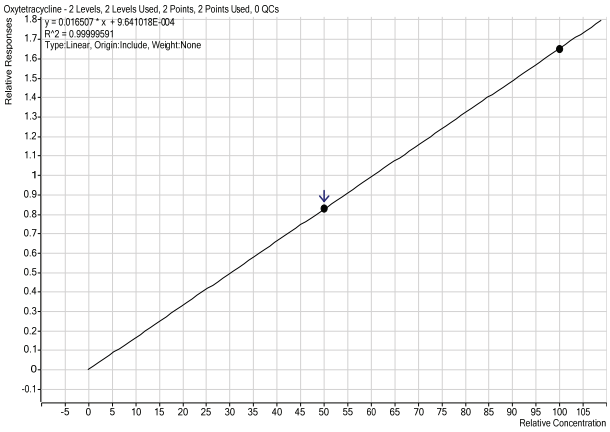


Şekil 3. Negatif olduğu bilinen tavuk eti üzerine özütleme-2'ye ait standartların eklenmesi ile elde edilen kromatogram.

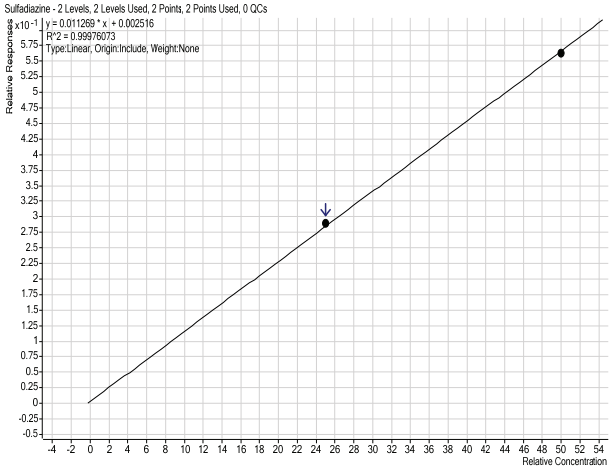
Şekil 4'de amoksisiline, Şekil 5'te oksitetrasikline, Şekil 6'da sülfadiazine, Şekil 7'de marbofloksasine, Şekil 8'de eritromisine, Şekil 9'da trimetoprime, Şekil 10'da kloramfenikole ait kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



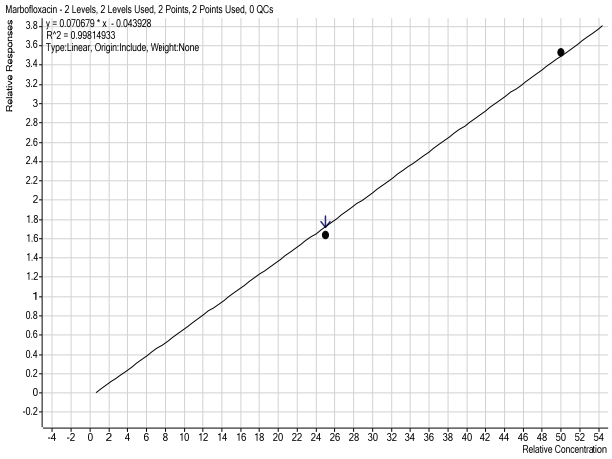
Şekil 4. Amoksisilin kalibrasyon eğrisi.



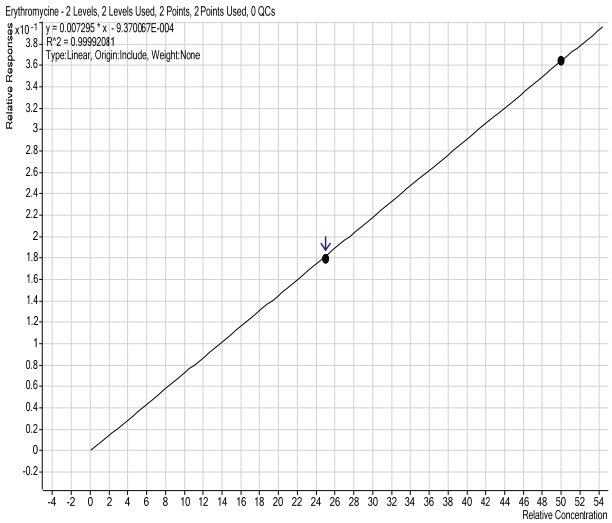
Şekil 5. Oksitetrasiklin kalibrasyon eğrisi.



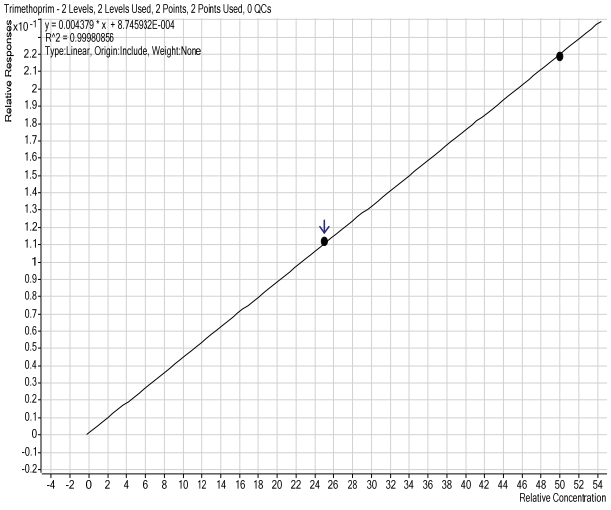
Şekil 6. Sülfadiazin kalibrasyon eğrisi.



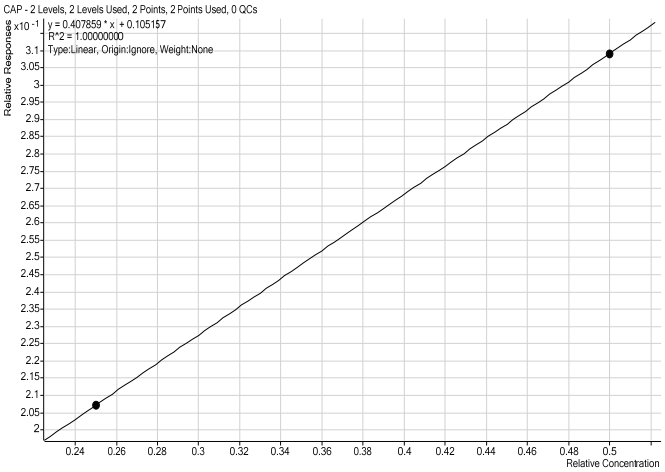
Şekil 7. Marbofloksasin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 8. Eritromisin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 9. Trimetoprim kalibrasyon eğrisi.



Şekil 10. Kloramfenikol kalibrasyon eğrisi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde farklı tarama ve doğrulama analiz metotları kullanılmaktadır. Kullanılan tarama metotları ile kısa zamanda çok sayıda numune antibiyotik kalıntısı yönünden analiz edilmektedir. Ancak her antibiyotik grubu için farklı kit kullanıldığından ekonomik açıdan büyük yük getirmekte, zaman kaybı olmakta ve kimyasal madde tüketimi artmaktadır.

Hurtaud-Pessel ve ark. (7) hayvansal kas dokularında LC-MS/MS sisteminde antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi için çoklu kalıntı tarama analizi için metot geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri metotta sülfonamid grubundan 9, tetrasiklin grubundan 4, kinolon grubundan 10, beta laktam grubundan 11, makrolid grubundan 6 ve aminoglikozid grubundan 6 olmak üzere toplam 42 bileşiği 2 özütleme işlemi yaparak LC-MS/MS sistemine 2 enjeksiyon ile vermişler ve bileşikleri azami kalıntı seviyesinde tespit etmişlerdir. Negatif modda çalışma yapmamışlar sadece pozitif moddaki bileşikleri iki ayrı özütleme işlemi ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmada pozitif modda aminoglikozid grubu bileşik tespit edilememiş ancak diaminoprimidin türevi bileşik tespit edilmiş, negatif modda bulunan 3 bileşik ikinci özütleme ve ikinci enjeksiyon ile tespit edilmiştir.

Granelli ve ark. (6) domuz ve sığır kas dokusunda LC-MS/MS sisteminde antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi için çoklu kalıntı tarama analizi için metot geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri metotta sülfonamid grubundan 4, tetrasiklin grubundan 4, kinolon grubundan 4, beta laktam grubundan 3, makrolid grubundan 4 bileşik olmak üzere toplam 19 bileşiği tek özütleme işlemi uygulayarak LC-MS/MS sistemine tek enjeksiyon ile vermişler ve < 1/4 azami kalıntı seviyesinde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Granelli ve arkadaşlarının tespit ettiği bileşikten daha fazla bileşik pozitif modda tespit edilmiştir.

Yamada ve ark. (13) domuz, sığır ve tavuk kas dokularında antibiyotik, hormon, antelmentik ve diğer bazı maddelerin belirlenmesi için LC-MS/MS sisteminde çoklu kalıntı tarama analizi için metot geliştirmişlerdir. Metot, tavuk kas dokusunda 61 antibiyotik etkin maddesini 0.03-3.0 µg/kg seviyesinde tespit etmekte olup ölçüm limitini 0.1-10 µg/kg aralığında belirtmişlerdir. Bu çalışmada tespit edilen bileşikten daha fazla bileşiği Yamada ve arkadaşları her iki modu kullanarak tespit etmişlerdir.

Carretero ve ark. (3) domuz ve sığır kas dokusunda antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi için LC-MS/MS sisteminde metot geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri doğrulama analiz metodu beta laktam, sülfonamid, tetrasiklin, linkozamid, makrolid, kinolon, nitroimidazol ve diaminoprimidin grubundan 31 antibiyotik etkin maddesini 3-15 µg/kg seviyesinde tespit etmekte olup ölçüm limiti 10-50 µg/kg aralığındadır. Bu çalışmada tarama analizi metodu geliştirilmiş ve daha fazla bileşik tespit

edilmiştir. İki metot tespit edilen bileşik sayısı yönünden birbiri ile uyum göstermektedir.

Chico ve ark. (4) hayvan kökenli gıdalarda LC-MS/MS sisteminde antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi için metot geliştirmişlerdir. Penisilin, sülfonamid, tetrasiklin, makrolid ve kinolon grubundan 39 antibiyotik etkin maddesini etkili bir özütleme işlemi ile tek enjeksiyonda tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da pozitif modda 36 antibiyotik etkin maddesi tespit edildiği için Chico ve arkadaşlarının çalışması ile bileşik sayıları yönünden uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmada geliştirilen metot ile yedi grup antibiyotik etkin maddesinin iki özütleme işlemi ile LC-MS/MS sistemine iki enjeksiyonda verilerek tespit edilmesi sayesinde kitlere olan ihtiyaç ve kullanılan kimyasal madde miktarı azaldığından ekonomiye ve kimyasal madde kullanımının azalması kimyasal atık miktarını da azalttığından çevre kirliliğinin azalmasına katkı sağlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Anon** (2002) *Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.* Off J Eur Comm., L221: 8–36.
2. **Anon** (2011) *Türk Gıda Kodeksi.* Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Veteriner İlaçlarına Ait Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (2011/20 sayılı). 29.04.2011 tarih ve 27919 (mükerrer) sayılı RG.
3. **Carretero, V., Blasco, C., Pico, Y.** (2008*) Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1209: 162-173.
4. **Chico, J., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R., Prat, M.D., Granados, M.** (2008) *High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1213: 189-199.
5. **Community Reference Laboratories Residues (CRLs)** (2010) *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer)*. Erişim: http://ec.europa.eu/food/ food/ chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening _en.pdf. Erişim tarihi: 24.02.2011.
6. **Granelli, K., Elgerud, C., Lundström, A., Ohlsson, A., Sjöberg, P.** (2009) *Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.* Anal. Chim. Acta, 637: 87-91.
7. **Hurtaud-Pessel, D., Gautier, S., Juhel-Gaugain, M., Verdon E.** (2008) *Screening of veterinary antibacterial residues in muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry : Method validation.* EuroResidue IV Conference on Residues of Veterinary drugs in food, May 19-21, Egmond aan Zee, Netherland.
8. **Kaya, S.** (1994) *Besinlerdeki Veteriner İlaç Kalıntıları, Bilimsel ve Yasal Denetim.* Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim 13-14, Ankara, Türkiye.
9. **Kaya, S.** (2005) *Gıdalarda Veteriner Hekimliği İlaçları ile İlgili Kalıntı Sorunu.* Birinci Ulusal Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Eylül 22-24, Ankara, Türkiye.
10. **Marazuela, M.D., Bogialli, S.** (2009) *A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods.* Anal. Chim. Acta, 645: 5-17.
11. **Muñoz, P., Blanca, J., Ramos, R., Bartolomé, M., Garc´Ia, E., Méndez, N., Gomez, J., Pozuelo, M.M.** (2004) *A versatile liquid chromatography–tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs.* Anal. Chim. Acta, 529: 137–144.
12. **Şanlı, Y.** (1994) *Hayvan Yetiştiriciliğinde Antibakteriyel İlaç Kullanımı ve Çok Yönlü Sakıncaları.* Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim 13-14, Ankara, Türkiye.
13. **Yamada, R., Kozono, M., Ohmori, T., Morimatsu, F., Kıtayama, M.** (2006) *Simultaneus determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (1): 54-65.

Yazışma Adresi:

Dr. Yasemin COŞKUN
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Toksikoloji Bölümü.
35010 Bornova / İZMİR
E-posta: yasemincoskun71@gmail.com

Bornova Vet. Bil. Derg.,
34 (48): 31-38, 2012

TÜRKİYE'DE İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS VE VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ HASTALIKLARININ DURUMU

THE SITUATION OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS AND VIRAL HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA IN TURKEY

Gülnur KALAYCI[1] Şerife İNÇOĞLU[2] Buket ÖZKAN ÖZYER[3] Yener KÜÇÜKALİ[4]

Geliş Tarihi (Received): 12.11.2012 Kabul Tarihi (Accepted): 05.12.2012

ÖZET

Su ürünleri sektöründe İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) ve Viral Hemorajik Septisemi (VHS) hastalıkları ekonomik ve ticari öneme sahip viral enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonları atlatan balıkların taşıyıcı kalarak virusların sirkülasyonuna ve yayılmasına neden olmaları önemlerini daha da artırmakta ve mücadele edilmesini de güçleştirmektedir. Bu çalışmada Balık Hastalıkları konusunda Ulusal Referans Laboratuvar olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nün Viroloji Bölümü tarafından IPN ve VHS hastalıkları yönünden 2004-2011 yılları arasında yapılan rutin teşhis, hastalık kaynağını araştırma amaçlı epidemiyolojik tarama, bölge durumlarının belirlenmesi amaçlı epidemiyolojik tarama ve hastalık sonrası hastalık izleme çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

Anahtar kelimeler: İPN, taşıyıcılık, teşhis, Türkiye, VHS.

SUMMARY

Infectious pancreatic necrosis (IPN) and viral haemorrhagic septicaemia (VHS) are economically and commercially important viral diseases in the aquaculture sector. The circulation and spread of infections caused by the fish in population that remain as carriers after acute phase of the infection increases the importance of these diseases and also makes it difficult to control and eradication. The results of the routine laboratory diagnosis, the epidemiological screening for the determination of the origin of the diseases and of the situation of the geographical regions, and disease monitoring studies after the diagnosis of diseases carried out by Virology Department of Bornova Veterinary Control Institute, National Reference Laboratory of Fish Diseases in Turkey, for IPN and VHS between 2004 and 2011 are presented in this article.

Key words: Carrier, diagnosis, IPN, Turkey, VHS.

GİRİŞ

Ülkemizde 70'li yıllarda alabalık ve sazan yetiştiriciliği, 80'li yıllarda ise levrek ve çipura yetiştiriciliği başlamış ve hızla büyüyerek 2011 yılında en fazla büyüyen sektör olmuştur. Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2007 yılı verilerine göre kültürü yapılan balık türlerinin % 41.80'ini alabalık, % 30'unu levrek, % 24'ünü ise çipura oluşturmaktadır. Özellikle Avrupa Birliği Ülkelerine yapılan ihracatta büyük ekonomik öneme sahiptir.

Gerek iç piyasada gerekse ihracatta hem işletmelerin verimliliği ve kazancı hem de tüketici sağlığı açısından balık sağlığı birinci derecede önemlidir. Balık sağlığı konusunda tedavilerinin olmaması, yüksek ekonomik kayıplara yol açması, kontrol ve mücadelelerinin güçlüğü nedeniyle viral balık hastalıkları özel bir konuma sahiptir.

[1] Dr. Uzm.Vet. Hekim, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[2] Dr. Biyolog, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[3] Dr. Vet. Hekim, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[4] Veteriner Sağlık Teknikeri, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR

İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) bilhassa genç Salmonidlerin çok bulaşıcı viral bir enfeksiyonudur (13, 33). Özellikle yavru balıklarda (fry ve fingerling) mortalite oranı yüksektir. IPN virusu (IPNV), çizgili levrek, levrek, ringa, halibut, kalkan, sarıkuyruk, yılan balığı, pisi balığı gibi deniz balıklarında da mortaliteye neden olabilmektedir (8, 22, 24). IPN ve IPN benzeri viruslar, tatlısu ve tuzlu sularda yaşayan 60'dan fazla türden izole edilmiştir. Hastalık dünya üzerinde geniş bir coğrafik alanda görülmekte olup Kuzey ve Güney Amerika'da, Avrupa ve Asya'da yaygın seyretmektedir (6).

Hastalığın etkeni Birnaviridae familyasında yer alan çift iplikçikli RNA içeren IPN virusudur. Virusun Sp, Ab ve VR299 olmak üzere 3 majör serotipine ilaveten 7 serotipi daha olduğu bildirilmektedir (9, 14, 19).

Virus, su yolu ile horizantal, yumurta yolu ile de vertikal olarak bulaşmaktadır ve yumurtaların dezenfeksiyonu vertikal bulaşmayı önlememektedir. Klinik olarak hasta balıklar ve klinik bulgu göstermeyen asemptomatik taşıyıcı balıkların dışkıları ile ortama yüksek oranda virus saçıldığı saptanmıştır (1, 2, 18, 33). Virus suşu, patojenitesi, konakçı ve çevre faktörlerine bağlı olarak kümülatif mortalite % 10-90 arasında değişmektedir. Hastalığı atlatanlar taşıyıcı kalmakta ve yaşamları boyunca dışkıları, vücut sıvıları ve seksüel sıvıları ile virus saçmaktadır (12, 20, 33).

Klinik bulgu olarak tirbişon şeklinde yüzme, su çıkışına toplanma, abdominal şişkinlik, baş bölgesinde küçük şişlikler, renkte koyulaşma (vücudun arka 1/3 lük bölümünde daha fazla), ekzoftalmus, uzamış halde dışkı (pseudofeces) görülebilir. Otopside mide ve bağırsakların besinden yoksun, renksiz-sarı sütümsü jelatinimsi bir eksudat ile dolu olduğu görülür. Bazen iç organlarda kanamalar görülebilir.

Hastalığın tanısında klinik enfekte ve asemptomatik balıklardan Blue gill fry (BF-2), Rainbow trout gonad (RTG-2), Chinook salmon embryo (CHSE-214) veya Fat head minnow (FHM) hücre kültürlerinde virus izolasyonunu takiben Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) ve serum nötralizasyon test ile identifikasyon yapılmaktadır (6, 25).

Viral Hemorajik Septisemi (VHS) hastalığı öncelikle alabalık, turna balığı ve kalkanlarda yüksek ölümle seyreden ekonomik açıdan önemli viral bir enfeksiyondur. Hastalığın etkeni Rhabdoviridae familyasının Novirhabdovirus genusunda yer alan Viral Hemorajik Septisemi virusu (VHSV) olup dört genotipi bulunmaktadır. Özellikle alabalık, turna balığı ve kalkanlarda yüksek ölümle seyreden ancak 45 değişik kültür, doğal tatlısu ve deniz balığı türünde izole edilmiş olan VHSV'nun türlere göre duyarlılığında farklılıklar bulunmaktadır (29). VHSV, Avrupa, Kuzey Amerika ve Doğu Asya'da birçok tatlısu denizbalığı türünden izole edilmiştir. Bir çok deniz türünün de taşıyıcı olduğu bildirilmiştir (11, 21, 23, 31, 32). Virus, su yolu ile horizantal olarak bulaşmaktadır. Klinik olarak hasta ve klinik bulgu göstermeyen asemptomatik taşıyıcı balıkların dışkıları ile ortama yüksek oranda virus saçıldığı saptanmıştır. Vertikal bulaşmaya ilişkin kesin kanıtlar bulunmamaktadır (6). Klinik olarak anemi, ekzoftalmus, vücudun yan kısımlarında kanamalar görülmektedir. Histopatolojik olarak karaciğer, dalak, hematopoetik organlarda kanamalar ve nekrotik değişiklikler görülmektedir (15, 33).

Hastalığın tanısında klinik enfekte ve asemptomatik balıklardan Epithelioma papulosum cyprini (EPC), BF-2 veya FHM hücre kültürlerinde virus izolasyonunu takiben IFAT, reverse transcriptase- polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile identifikasyon yapılmaktadır (6, 10).

MATERYAL-METOT

Materyal

Referans Virus Suşları: Virus izolasyonu ve identifikasyon testlerinde pozitif kontrol olarak Danimarka'dan (AB Referans Laboratuvarı, Danish Institute for Food and Veterinary Research) sağlanarak Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümünde stoklanan referans IPN ve VHS virus suşları kullanılmıştır.

Hücre Kültürleri: Virus izolasyonu ve IFAT testlerinde Almanya'dan (Federal Research Centre

for Disease of Animals-Insel Riems) sağlanarak Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji Bölümünde stoklanan EPC, RTG ve BF-2 hücre kültürleri kullanılmıştır.

Balık Örnekleri: Çalışma materyalini, Ulusal Referans Laboratuvar olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Viroloji bölümüne 2004-2011 yılları arasında teşhis için gelen, Enstitü tarafından yürütülen epidemiyolojik tarama ve hastalık sonrası hastalık izleme çalışmaları için sağlanan alabalık, kalkan, levrek ve çipura balıkları oluşturmuştur. Teşhis amaçlı minimum 10 balık örneği, tarama amaçlı 30 balık örneği kullanılmıştır. 4 cm'den küçük balıkların bağırsak açıklığından arkada kalan kısmı çıkarılmış ve diğer kısımların tümü kullanılmıştır. 4-6 cm boyundaki balıklarda böbreği de içeren tüm iç organlar alınmıştır. 6 cm' den büyük balıklarda karaciğer, dalak, anterior böbrek ve ek olarak kalp veya beyin alınmıştır. Ovaryum sıvısı veya sperma örnekleri (bir tüpte 5-6 balığa ait) ile gözlenmiş yumurta örnekleri de transport vasatı içinde laboratuvara ulaştırılmıştır.

5-10 balığa ait iç organ örneklerinden veya ovaryum sıvısı/ sperma örneklerinden yada gözlenmiş yumurta örneklerinden bir grup oluşturularak homojenize edilmiş, % 1-2 antibiyotik-antimikotik, % 1-2 fetal calf serum (FCS) içeren minimal essential medium earle (E-MEM) vasat ilave edilerek doku materyalleri ile E-MEM vasat arasındaki son oran 1:10 oranında ayarlanmıştır. Homojenizat, 2-4ºC de soğutmalı santrifüjde 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant inokulum olarak kullanılmıştır.

Metot

Virus İzolasyonu: Virus izolasyonunda % 10 FCS, % 1 N-2- hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethane sulphonic acid (HEPES) içeren E-MEM vasatı kullanılarak hazırlanan 24 saatlik monolayer olan 24 gözlü pleytlerde üretilen EPC ve BF-2/RTG-2 hücre kültürü kullanılmıştır. Her bir gruptan 1/10 ve 1/100 dilüsyonlarda inokulasyon yapılarak 15ºC'de inkübe edilmiştir. Sitopatik etki (CPE) yönünden 7 gün gözlenmiş ve süre sonunda doku kültürü pleytleri dondurulup çözdürülerek CPE görülen örneklere identifikasyon testleri uygulanmıştır. CPE görülmeyen örneklere 24 gözlü pleytlerde üretilen hücre kültürlerinde 2 pasaj daha yapılmıştır. Her doku kültürü pleytinde 2 göz hücre kontrol bırakılmıştır. Her izolasyon çalışmasında bir doku kültürü pleytine de referans virus suşları aynı şekilde inoküle edilerek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. IPN tespit edilen örnekler virusun baskılayıcı özelliğinden dolayı IPN hiperimmun serumu ile nötralize edilerek aynı işlem basamakları tekrarlanmıştır (3, 6).

Virus İdentifikasyonu

Enzyme linked ımmunosorbent assay (ELISA): Sitopatik efekt tespit edilen hücre kültürü süpernatantlarının, kit prosedürü uygulanarak kullanılan ticari ELISA kitleri (Bio-X, Belçika, TEST-LINE, Çek Cumhuriyeti) ile IPN ve VHS virusları yönünden identifikasyonu yapılmıştır (5, 6).

İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT) : Sitopatik efekt gösteren örnekler ve pozitif kontrol olarak kullanılan virus suşlarından 24 gözlü pleytlerde üretilen EPC ve BF/RTG hücre kültürlerine ekim yapılmış ve 15ºC'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra ticari IFAT kitleri (Bio-X, Belçika) ile IPN ve VHS virusları yönünden identifikasyonu yapılmıştır (4-6).

BULGULAR

Makroskopik Bulgular

IPNV izole edilen alabalıkların bazılarında bir veya iki gözde ekzoftalmus, karında şişme, renkte kararma, anüsten uzamış dışkı ve iskelet bozuklukları, otopside mide-bağırsaklarda sarı jelatinöz sıvı görülmüştür. Ancak bu bulgular daha çok küçük balıklarda veya yüksek mortalite ile seyreden olgularda görülmüştür. Büyük balıklarda ve/veya taşıyıcılığın şekillendiği olgularda ekzoftalmus, renkte hafif kararma görülmüş veya hiçbir klinik bulgu tespit edilmemiş olup epidemiyolojik taramalar sırasında virus tespit edilmiştir.

IPNV izole edilen levreklerin bazılarında bir veya iki gözde ekzoftalmus, karında şişme ve renkte kararma görülmüş ancak çoğunlukla belirgin bir klinik bulgu görülmemiştir.

VHSV izole edilen alabalık ve kalkanlarda gözlerde ekzoftalmus, renkte koyulaşma veya nok-

ta şeklinde kanamalar, solungaçlarda, karaciğerde ve intestinal bölgede kanama görülmüştür.

VHSV izole edilen levrek ve çipuralarda deride az sayıda nokta şeklindeki kanamalar dışında belirgin bir klinik bulgu görülmemiştir.

Virus İzolasyon ve İdentifikasyonu

Küçük balıklardan veya yüksek mortalite ile seyreden IPN olgularından virus izolasyonunda genellikle RTG/ BF-2 hücre kültürlerindeki birinci pasajda CPE görülmüş ve ELISA ve/veya IFAT ile identifiye edilmiştir.

Taşıyıcılık olgularında veya düşük mortalite ile seyreden IPN olgularında ise genellikle ikinci veya üçüncü pasajda CPE görülmüş ve ELISA ve/veya IFAT ile identifiye edilmiştir.

Alabalık ve kalkanlardan izole edilen VHS olgularında virus izolasyonunda EPC hücre kültürlerindeki birinci pasajda CPE görülmüş ve ELISA ve/veya IFAT ile identifiye edilmiştir.

Levrek ve çipuralardan izole edilen VHS olgularında ise genellikle ikinci veya üçüncü pasajda CPE görülmüş ve ELISA ve/veya IFAT ile identifiye edilmiştir.

2004-2011 yıllarında çalışma yapılan işletme sayıları ve pozitif/negatif işletme oranları Tablo 1'de, IPN tespit edilen alabalık işletmelerinin bulunduğu iller, Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 1. 2004-2011 yıllarında çalışma yapılan işletme sayıları ve pozitif/negatif işletme oranları

BALIK	2004		2005		2006		2007	
TÜRÜ	IPN	VHS	IPN	VHS	IPN	VHS	IPN	VHS
ALABALIK	2/4	0/4	7/13	0/13	14/27	1/27	39/105	1/104
KALKAN	0/4	2/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3
ÇİPURA	0/4	1/4	0/8	0/8	0/15	0/15	-	-
LEVREK	1/7	4/7	0/17	0/17	0/16	0/16	4/4	0/4
Toplam	3/19	7/19	9/40	0/40	14/60	1/60	43/112	1/111

BALIK	2008		2009		2010		2011	
TÜRÜ	IPN	VHS	IPN	VHS	IPN	VHS	IPN	VHS
ALABALIK	7/11	0/11	14/74	0/74	23/108	0/108	1/53	0/53
KALKAN	0/1	0/1	0/3	3/3	-	-	-	-
ÇİPURA	0/16	0/16	0/2	0/2	0/10	0/10	0/4	0/4
LEVREK	0/10	0/10	0/10.	0/10	3/23	0/23	0/9	0/9
Toplam	7/38	0/38	14/89	3/89	26/141	0/151	1/66	0/66

Tablo 2. IPN tespit edilen alabalık işletmelerinin bulunduğu iller

2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Adana	Denizli	Antalya	Antalya	Bolu	Ankara	Adıyaman	Elazığ
Antalya	Hatay	Burdur	Aydın	İzmir	Artvin	Ankara	
Trabzon	Uşak	Denizli	Bolu	Muğla	Bilecik	Antalya	
	Trabzon	Hatay	Gümüşhane	Tokat	Bolu	Artvin	
		Ordu	Kayseri		Düzce	Aydın	
			Muğla		Zonguldak	Bolu	
			Ordu			Düzce	
			Samsun			Eskişehir	
			Tokat			Kahramanmaraş	
			Trabzon			Sakarya	
						Trabzon	

Levreklerden IPN izolasyonu, Antalya, Muğla ve Ordu illerinden yapılmıştır.

2004-2011 yılları arasında izole edilen 112 adet IPN izolatından 38 adedi Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı "Danish Institute for Food and Veterinary Research' tarafından teyit edilmiş ve Sp serotipi olarak serotiplendirilmiştir.

Alabalıklardan VHS izolasyonu, ilk kez 2006 yılında Bolu ilinden yapılmıştır. 2007 yılındaki VHS enfeksiyonu'nun IPN enfeksiyonu ile birlikte seyrettiği tespit edilmiştir.

Kalkanlardan 2004 yılındaki VHS izolasyonu, Trabzon ve Muğla illerinden yapılmıştır. 2009 yılındaki izolasyon ise Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından doğal kalkanlardan yapılmış olup Enstitümüz tarafından teyidi yapılmıştır.

Alabalık ve kalkanlardan izole edilen izolatlar, Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı "Danish Institute for Food and Veterinary Research' tarafından teyit edilmiş ve Genotip 1 olarak belirlenmiştir.

Levreklerden VHS izolasyonu, Antalya, Muğla, ve İzmir İllerinden, çipuralardan VHS izolasyonu ise İzmir ilinden yapılmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

IPN, VHS, İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (IHN) hastalığı ve Epizootik Hematopoietik Nekrozis (EHN) hastalıklarının etkeni olan virusların izolasyon ve identifikasyonunda Uluslararası standartlar gereği Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün Su Hayvanları Teşhis Testleri El Kitabında verilen ve Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı'nın kullandığı örnek alma yöntemleri, hücre kültürleri ve izolasyon yöntemleri kullanılmaktadır (4-6).

2004 yılından itibaren Ulusal Referans Laboratuvar olan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından viral balık hastalıklarının teşhisine başlanması ile rutin teşhis, hastalık kaynağını araştırma amaçlı epidemiyolojik tarama, bölge durumlarının belirlenmesi amaçlı epidemiyolojik tarama ve hastalık sonrası hastalık izleme çalışmaları da başlamıştır. Hastalık kaynağını araştırma amaçlı epidemiyolojik tarama çalışmalarında hastalık çıkan işletme ile aynı su kaynağında bulunan işletmeler, yavru-yumurta-balık satın aldığı ve sattığı işletmeler ve yem alışverişi yaptığı işletmelerde bulunan tüm türlerden örnekleme yapılarak incelenmektedir. Bölge durumlarının belirlenmesi amaçlı epidemiyolojik tarama çalışmalarında bir bölgede bulunan bütün işletmelerden örnekleme yapılarak incelenmektedir. Hastalık sonrası hastalık izleme çalışmasında ise ihbarı mecburi hastalık çıkan işletme, tekrar balıklandırıldıktan sonra 2 yıl süre ile kapasitesine uygun örnek sayısı ile izlenmektedir.

Alabalıklarda IPN, VHS, IHN ve EHN hastalıkları ekonomik ve ticari öneme sahip hastalıklardır. Kalkanlarda ise VHS hastalığı büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (17, 26, 28, 29). VHS, IHN ve EHN, Avrupa Birliği 2006/88/EEC komisyon kararlarında ve bu doğrultuda hazırlanan Su Hayvanlarının Sağlık Koşulları ile Hastalıklarına Karşı Korunma ve Mücadele Yönetmeliği kapsamında yer alan hastalıklar olup ihbarı mecburi hayvan hastalıkları arasında bulunmaktadır. Bugüne kadar yapılan teşhis, tarama ve araştırma çalışmalarında IHN ve EHN hastalıkları henüz ülkemizde tespit edilmemiştir.

IPN virusu, Türkiye'de ilk kez 2002 yılında enfekte alabalık dokularından RT-PZR kullanılarak teşhis edilmiştir (7). 2004 yılından itibaren sürdürülen epidemiyolojik taramalar ve IPN hastalığının ihbarı mecburi olduğu 2004-2007 yılları arasında yapılan hastalık sonrası hastalık izleme çalışmaları sonucunda hastalığın aynı kaynaktaki işletmelere su ile yayıldığı, farklı kaynaktaki veya ildeki işletmelere ise yavru-yumurta-balık alışverişi ile bulaştığı çok açık bir şekilde belirlenmiştir. Alabalıklarda epidemiyolojik tarama ve hastalık sonrası hastalık izleme çalışmalarında örnekler, IPN, VHS, IHN ve EHN virusları yönünden incelendiğinden örnekleme su ısısının 15ºC'nin altına düştüğü dönemde yapılmaktadır. Bu çalışmalarda ve teşhis çalışmalarında yüksek mortalite ile seyreden olguların 9-12ºC su ısılarında görüldüğü, daha yüksek ısılarda ise virusun tespit edildiği ancak mortalite oranının düştüğü yada görülmediği tespit edilmiştir. Salgınların ve yüksek mortalite ile seyreden olguların

sıcak bölgelerde ilkbahar aylarında, serin bölgelerde ise ilkbahar sonu ve yaz başında görüldüğü saptanmıştır. Bu durum İspanya'da yapılan çalıma ile paralellik göstermektedir (27). Yüksek mortalite genellikle fry ve fingerlinglerde görülmektedir. Ancak hastalığın epidemik olduğu yerlerde, bakım ve beslemenin iyi olmadığı, balık yoğunluğunun ve stresin fazla bulunduğu işletmelerde ve bakteriyel ve paraziter etkenlerin katılımı durumlarında erişkin balıklarda da mortalite oranının % 30-40'a ulaştığı olgular görülmüştür. Hastalığın endemik olduğu işletmelerde/yerlerde mortalite oranının düştüğü ancak taşıyıcılığın arttığı tespit edilmiştir.

Trabzon, Denizli ve Aydın illerinde hastalığın yavrularda yüksek mortalite ile seyrettiği işletmelerde yapılan çalışmalarda; ovaryum sıvıları, sperma ve yumurtalardan IPN virusu izole edilmiştir. Bu şekilde vertikal bulaşma da tespit edilmiştir. Ayrıca klinik bulgu göstermeyen ancak taşıyıcılık tespit edilen işletmelerde de yıllarca virus sirkülasyonunun devam ettiği görülmüştür. Bu bulgular, IPN virusunun horizantal ve vertikal bulaşma yolları ve taşıyıcı balıkların enfeksiyonun sürekliliğinden sorumlu olduğuna ilişkin literatür bilgileri ile paralelik göstermektedir (1, 2, 18, 33).

Antalya ve Muğla İllerinde levreklerden tespit edilen IPN olgularının ise sporadik olduğu ve virusun muhtemelen doğal balıklardan geçtiği düşünülmektedir. Çünkü teşhis amaçlı olarak gönderilen bu örneklerde bakteriyel enfeksiyonun yanısıra IPN virusu tespit edilmiş ancak 2 yıllık hastalık sonrası hastalık izleme çalışması sırasında bu işletmelerde tekrar virus tespit edilmemiştir.

Ordu İli Perşembe İlçesindeki deniz kafeslerinde yetiştirilen levreklerde tespit edilen IPN olgularında ise bulaşmanın alabalıklardan olduğu tespit edilmiştir. Aynı alanda çok sayıda kafes bulunduğu ve bu kafeslerin bir kısmında alabalık, bir kısmında ise levrek yetiştiriciliği yapıldığı görülmüştür. Bu bölgede yapılan tarama çalışmalarında alabalık kafeslerinin çoğundan ve levrek yetiştiriciliği yapılan kafeslerin bazılarından virus izole edilmiştir.

Türkiye'de VHS virusu ilk kez 2004 yılında Trabzon İlinde Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait tesiste 15 günlük kültüre kalkan fry'larından tespit edilmiştir. Salgın bahar aylarında suların dalgalandığı dönemde olmuş ve 15-20 günlük fry'larda % 99 ölümle seyretmiştir. Tesise giren suyun filtre edildiği sistemin bakteri girişini önleyici, ancak virus girişini önleyemeyecek özellikte olması, bulaşmanın su ile olabileceği düşüncesini uyandırmıştır (17). 2006 yılında Karadeniz'de yapılan bir çalışmada doğal kalkan balıklarından da VHS virusu izole edilmiş (16*)* ve teyiti yapılmıştır. Bu çalışmada bulaşmanın su yolu ile olduğu düşüncesini daha da kuvvetlendirmektedir. Hastalık çıkışını takiben yapılan epidemiyolojik çalışma sırasında kalkan balığı gönderilen Muğla İlindeki işletmede de kalkanlarda VHS virusu tespit edilmiştir. 91/67 sayılı Avrupa Birliği Direktifi hükümleri uygulanarak alınan kontrol ve karantina tedbirleri ve İzleme süresince üretim amaçlı balık çıkışlarının engellenmesi ile hastalığın yayılması önlenmiştir.

Alabalıklardan VHS virusu izolasyonu ilk kez 2006 yılında Bolu İli Mudurnu İlçesinden teşhis amaçlı gelen fry'lardan tespit edilmiştir. Salgın, Haziran ayında 10-11ºC su ısısında görülmüş ve % 90 ölüm ile seyretmiştir. Dolayısıyla enfeksiyonun giriş yolu belirlenememiştir. 91/67 sayılı Avrupa Birliği Direktifi hükümleri uygulanarak alınan kontrol ve karantina tedbirleri ve İzleme süresince üretim amaçlı balık çıkışlarının engellenmesi ile hastalığın yayılması önlenmiştir. 2 yıl süreli hastalık sonrası hastalık izleme çalışması süresince tekrar virus izole edilmemiştir. Ancak hastalık çıkışını takiben Bolu ve çevresindeki illerde 2 yıl süreli yapılan epidemiyolojik tarama çalışması sırasında 2007 yılında bu işletme ile yem alışverişi yapan Bolu ilindeki bir işletmede VHS virusu ve IPN virusu tespit edilmiştir. Bu işletmede de dolayısıyla enfeksiyonun giriş yolu belirlenememiştir. 91/67 sayılı Avrupa Birliği Direktifi hükümleri uygulanarak alınan kontrol ve karantina tedbirleri ve İzleme süresince üretim amaçlı balık çıkışlarının engellenmesi ile hastalığın yayılması önlenmiştir. 2 yıl süreli hastalık sonrası hastalık izleme çalışması süresince tekrar virus izole edilmemiştir.

Sonuç olarak; su ürünleri sektöründe ekonomik kayıpların azaltılması, karlılığın ve verimliliğin artırılması için teşhis, tarama ve izleme çalışmalarının yaygınlaştırılarak sürdürülmesi, üretici-

lerin yumurta, yavru veya balık alırken kontrol belgesi istemeleri veya kontrol testlerini yaptırarak almalarının sağlanması ve özellikle kuluçkahanelere sertifikasyon zorunluluğunun getirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Ahne, W., Negele, R.D.** (1985) *Studies on transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish*. 261-269. In: Allis, A.E.(Ed): Fish and Shellfish Pathology, Academic Press, London, UK.
2. **Ahne, W., Jorgensen, P.E.V., Olesen, N.J., Fischer-Scheri, T., Hoffman, R.** (1989*) Aquatic Birnaviruses: virus of the serogrup II isolated from an IPN outbreak in brook trout (Salvelinus fortinalis)*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 9: 14-16.
3. **Anonim** (2001) *Commission Decision 2001/183/EC of 22 February 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods fort he detection and confirmation of certain fish disease and repealing Decision 92/533/EEC.*
4. **Anonim** (2004) *Workshop on the diagnosis of Fish Disease*, Hangovej, Aarhus, Denmark 23-26 February.
5. **Anonim** (2006) *Infectious Pancreatic Necrosis.* Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. OIE.12, Rue de Prony, Paris. 176-185.
6. **Anonim** (2011) *Viral Haemorrhagic Septicaemia*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.3.09.VHS.pdf
7. **Candan, A.** (2002) *First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22 (1): 45-48.
8. **Castric, J., Baudin-Laurench, F., Cowtwns, M.F., Auffret, M.** (1987) *Isolation of infectious pancreatic necrosis virus Ab serotype from a epizootic in farmed turbot (scophtalmus maximus) and scallups (pecten maximus.* Aquaculture, 67: 117-126.
9. **Christie, K.E., Havarstein, L.S., Djupvic, S.** (1990) *Infectious Pancreatic Necrosis in Norway, partial serotyping by monoclonal antibodies.* J. Fish Dis., 13: 323-327.
10. **Dale, O.B.**, **Orpetveit, I., Lyngstad, T.M., Kahns, S., Skall, H.F., Olesen, N,J., Dannevig, B.H.** (2009) *Outbreak of viral haemoorrhagic septicaemia (VHS) in sea-water-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Geotype III, 2009*. Dis. Aquat. Org., 65: 93-103.
11. **11. Dixon, P.F.**, **Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D.M., Way, K.** (1997*) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from Atlantic herring Clupea harengus from the English Channel*. Dis. Aquat. Org., 30:81-89.
12. **Dobos, P., Roberts, T.E.** (1983) *The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus a review.* Can. J. Gen. Microbiol., 29: 377-384.
13. **Hill, B.J.** (1982) *Infectious pancreatic necrosis and its virulence*. pp. 91-114. In: Roberts, R.J. (Ed): Microbial Diseases of Fish. Academic Press, London, UK.
14. **Hill, B.J., Way, K.** (1988) *Proposed standardisation of the serological classification of aquatic birnaviruses.* In Abstract of International Fish Health Conference, Vancouver, Canada, 154.
15. **Isshiki, T.**, **Nishizawa,T., Kobayashi, T., Nagano, T., Miyazaki, T.** (2001) *An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flound Paralichthys olvaceus in Japan*. Dis. Aquat. Org., 47: 87-99.
16. **Işıdan, H., Bolat, Y.** (2011) *A survey of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Turkey***.** Turk. J. Fish Aquat. Sci., 11: 507-513.
17. **Kalaycı, G.**, **İnçoğlu, Ş., Özkan, B.** (2006) *First isolation of viral haemorrhagic Septicaemia (VHS) virus from turbot (Scophthalmus maximus) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 26 (4): 156-161.
18. **Ledo, A., Barja, J.L., Toranzo, A.E., Perez, S.** (1994) *A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain.* Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 14 (2): 47-50.
19. **Lee, M.K., Blake, S.L., Singer, T., Nicholson, B.L.** (1996) *Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment lenght polymorphism.* Appl. Environ. Microbiol., 62 (7): 2513-2520.
20. **Mc Allister**, **P.E., Owens, W.J.** (1995) *Assesment of the virulence of fish and molluscan isolates of infectious pancreatic necrosis virus for salmonid fish by challenge of brook trout, Salvelinus fortinalis* (Mitchell). J. Fish Dis., 18: 97-103.
21. **Meyers, T.R.**, **Short. S., Lipson, K., Batts, WN., Winton, J.R., Wilcock, J., Brown, E.** (1994). *Association of viral hemorrhagic septicemia virus with epizootic hemorrhages of the skin in Pacific herring Clupea harengus pallasi from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA*. Dis. Aquat. Org., 19: 27-37.
22. **Mortensen**, **S.H., Hjeltnes, B., Rodseth, O., Krogsura, J., Christie, K.E.** (1990). *Infectious pancreatic necrosis virus serotype N1, isolated from Norwegian halibut (Hippoglassus hippoglassus), turbot (scophtalmus maximus) and scallapsus (pecten maximus)*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 10: 42-43.
23. **Mortensen, H.F.**, **Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L., Olesen, N.J.** (1999) *Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea.* Virus Res., 63: 95-106.
24. **Nakajima, K., Maeno, Y., Arimoto, M., Inouye, K., Sorimachi, M.** (1990) *Viral deformity of yellow tail fingerlings.* Fish. Pathol., 28: 125-129.

25. **Rodriquez, S., Vilas, P., Peres, S.** (1993) *A viral diagnostic survey of Spanish rainbow trout farms I sensitivity of four cell lines to wild IPNV isolates.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13 (4): 119-122.

26. **Ross, K., McCarthy, U., Huntly, P.J., Wood, B.P., Stuart, D., Rough, El., Smail, D.A., Bruno, D.W.** (1994) *An outbreak of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in turbot (Scophthal maximus) in Scotland*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14: 213-214.

27. **Sanjuan, M.L., Yus, E., Simarro, I., Castro, J.M., Perez, F., Solana, A.** (1994) *Infeksiyöz pancreatic necrosis virus from brown trout (Salmo trutta) and atlantic salmon (salmo salar) with high mortality in Spain.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.,14 (1): 5-7.

28. **Schlotfeldt, H.J.**, **Ahne, W., Jorgensen, P.E.V., Glende, W.** (1991) *Occurrence of viral hemorrhagic septicemia in turbot (Scophthalmus maximus)- a natural outbreak.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 11: 105-107.

29. **Skall, H.F., Olesen, N.J., Mellergaard, S.** (2005) *Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implication for fish farming - a review.* J. Fish Dis., 28: 509-529.

30. **Smail, D.A.** (1999) *Viral haemorrhagic septicaemia*. pp.123–147. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds): Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections, Volume 3, CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

31. **Stone, D.M.**, **Way, K., Dixon, P.F.** (1997) *Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North sea cod (Gadus morhua L.).* J. Gen. Virol., 78: 1319-1326.

32. **Takano, R.**, **Nishizawa, T., Arimoto, M., Muroga, K.** (2000) *Isolation of viral Haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, Paralichthys olivaceus.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 20: 186-192.

33. **Wolf, K.** (1988) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases.* pp:115-157. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.,USA.

Yazışma Adresi:

Dr. Gülnur KALAYCI
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Viroloji Bölümü
35040 Bornova-İZMİR
E-posta:gulnurunver@yahoo.com

Bornova Vet. Bil. Derg.,
34 (48): 39-42, 2012

VAKA RAPORU/ CASE REPORT

KEÇİLERDE TİLMİKOSİNİN SEBEP OLDUĞU ZEHİRLENME VAKASI

POISONING CASE CAUSED BY TILMICOSIN IN GOATS

Yasemin COŞKUN[1] İsmail Gölen[2] Sibel ÖNDEŞ[3] Ahmet Turan ERDOĞDU[2]

Geliş Tarihi (Received): 09.08.2012 Kabul Tarihi (Accepted): 03.09.2012

ÖZET

Bu çalışma, Tokat ili Reşadiye ilçesinde görülen keçi ölümlerinin sebebini ortaya koymak amacıyla yapıldı. Ölen keçilerde yapılan analizlerde makrolid türevi antibiyotiklerden tilmikosin saptandı. Yapılan analizlerde kalp kasında 22.9 mg/kg, karaciğerde 21.8 mg/kg, akciğerde 12.6 mg/kg, böbrekte 12.0 mg/kg tilmikosin tespit edildi. Yapılan analizler sonucunda keçi iç organlarında tespit edilen tilmikosin düzeyinin çok yüksek olduğu ve ölüm olaylarının tilmikosinden ileri gelmiş olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Keçi, tilmikosin, zehirlenme.

SUMMARY

The aim of this study was to find the cause of the goat deaths in Tokat- Reşadiye. Tilmicosin, which is one of the macrolid antibiotics, was found at the analyses of dead goats. Tilmicosin was detected at the analyses with a level of 22.9 mg/kg in cardiac muscle, 21.8 mg/kg in liver, 12.6 mg/kg in lung, 12.0 mg/kg in kidney. As a result of the analyses, it was concluded that the level of tilmicosin detected in the tissues of goats was very high and deaths were caused by tilmicosin.

Key words: Goat, poisoning, tilmicosin.

GİRİŞ

Tilmikosin, tilosinden hareketle sentez edilen 20-deokso-20-(3,5-dimetilpiperidin-1-yl) desmikosin yapısında yarı sentetik makrolid türevi bir antibiyotiktir (1, 5, 8, 10, 16). Desmikosin, C–20 aldehit gruplarının redüktif aminasyonu ile elde edilmiş ve bu yapısal değişim ile Gram pozitif mikroorganizmalara yönelik etki spektrumunda genişleme ve antibakteriyel etkisinde artış sağlanmıştır. Böylece memeli ve kanatlı türlerini kapsayacak ölçüde geniş konakçı yelpazesine sahip olmuştur. Tilmikosinin antibakteriyel etkisi, diğer makrolidlere benzer olarak ribozomların 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel protein sentezinin engellenmesinden kaynaklanmaktadır (10). Gram pozitif bakterileri, mikoplazmaları, bazı gram negatif organizmaları ve klamidyaların bazı üyelerini de içine alan geniş bir etki spektrumuna sahiptir (5). Antibakteriyel spektrumu tilosine benzer ancak *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica'*ya karşı etkinliği daha güçlüdür (5). İlaç sığır, koyun, domuz ve kanatlılarda *P. multocida* ve *M. haemolytica'*nın sebep olduğu solunum yolları hastalıklarında koruyucu sağaltıcı olarak da kullanılır (1, 2, 8, 10).

İlaç deri altı yolla tek sefer 10 mg/kg dozda uygulanır, uygulama yerinden hızla emilir. Sığırlara deri altı 10 mg/kg dozda verildiğinde yaklaşık 1

[1] Dr. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[2] Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR
[3] Kimyager, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR

saatte, koyunlara deri altı 10 mg/kg dozda verildiğinde yaklaşık 8 saatte plazma doruk yoğunluğuna ulaşır (1, 2, 9). Tilmikosin özellikle akciğerlerde birikir, yoğunluğu plazmadakinin 50–60 katına kadar çıkabilir. İlaç vücutta başlıca desmetiltilmikosine çevrilir; bu halde ve metabolitleri halinde vücudu terk eder (8). Sığırlarda uygulanan dozun yaklaşık %68-70'i dışkıyla, % 20-24'ü idrarla atılır (1, 3). İlaç 10 mg/kg dozda damar içi ve deri altı yolla uygulandığında damar içi yolla uygulamada 5 gün, deri altı yolla 28 gün sütte kalıntıları tespit edilmiştir (5). Tilmikosin sütle uzun süre atıldığı için süt veren hayvanlara, güvenliği kanıtlanmadığı için gebe hayvanlara uygulanmamalıdır (3, 8).

Makrolid türevi antibiyotiklerin uygulanmasından sonra sindirim sistemi rahatsızlıkları, sarılık ve karaciğer hasarı bildirilmiştir. Diğer makrolidlerden ayrı olarak tilmikosinin verilme yoluna ve dozuna bağlı olarak kardiyotoksisite yan etkisi vardır. Ayrıca uygulama yapılan bölgede geçici şişlik, dispne, anafilaksi, kollaps ve ölüme sebep olabilir (6). İlaç ağız yoluyla genellikle güvenlidir; ama parenteral yollarla çoğu hayvan türünde öldürücü olabilecek ölçüde tehlikelidir. Etkilenen hayvanlarda başlıca kalp kasının kasılma gücünde zayıflama ve debisinde düşme dikkat çeker (9). Tilmikosin kardiyotoksisiteye yol açmasından dolayı bütün türlerde damar içi yolla uygulanmamalıdır. Sığır, buzağı, koyun, keçi ve atlarda 10 mg/kg'dan daha az dozda damar içi uygulama zehirlenmeye hatta ölüme sebep olabilmektedir. Köpeklerde yapılan laboratuar çalışmalarında parenteral uygulamadan sonra taşikardi ve kalp kasılmasında azalma gözlenmiştir. Atlarda ve keçilerde kas içi ve deri altı 10 mg/kg'dan yüksek dozda uygulama yapıldığında zehirlenmeye sebep olması muhtemeldir (3).

Bu çalışmada Tokat ili Reşadiye ilçesinde makrolid türevi bir antibiyotik olan tilmikosinin sebep olduğu bir zehirlenme olgusu bildirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada materyal olarak Reşadiye İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü personeli tarafından alınan ölü bir keçiye ait karaciğer, kalp, akciğer ve böbrek numune olarak kullanıldı. Yetiştiricinin 150 keçisinden yaşı küçük 50 keçisinin tilmikosinin derialtı uygulamasını takiben bir saat içinde öldüğü bildirildi.

Numunelerden tilmikosinin özütlenmesi disodyum EDTA ve metanolle gerçekleştirildi. Homojen hale getirilen materyalden 2.0±0.01 gram tartıldı. Üzerine roksitromisin iç standardından yükleme yapıldı ve birkaç saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra 200 µl 0,1 M Na_2EDTA ve 10 ml % 70'lik metanol eklendi. Vorteks ile 15 dakika karıştırılarak, 18 dakika 3°C'de 4000 devirde santrifüj edildi. Üst fazdan 0.5 ml alınarak temiz bir cam tüpe aktarıldı. Üzerine 2 ml su eklenerek 2 dakika vorteks ile karıştırıldı. Özüt 0.45 µm filtreden geçirilerek otomatik örnekleyici vialine alındı ve LC-MS/MS sistemine 20 µl enjekte edildi. Standart ilave edilmiş materyal kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre değerlendirme yapıldı. Numunelerin özütlenmesi ve sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometre cihazında, tilmikosinin belirlenmesi Granelli ve ark. (7) tarafından bildirilen yönteme göre gerçekleştirildi.

BULGULAR

Hayvanlara tilmikosin uygulanmasından sonra ölüm olaylarının meydana geldiği bildirildiğinden keçi iç organ numuneleri, tilmikosin yönünden analiz edildi. Yapılan analizler sonucunda iç organlarda tespit edilen tilmikosin miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İç Organ Numunelerinde Tespit Edilen Tilmikosin Miktarları.

Materyal	Tilmikosin Miktarı (mg/kg)
Kalp	22.9
Karaciğer	21.8
Akciğer	12.6
Böbrek	12.0

TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvanların ilaçlara karşı olan duyarlılıkları genellikle ayrım gösterir. Etki yerlerinde yeterli ilaç yoğunluğunun sağlanmasıyla ilaca özgü farmakolojik etkiler elde edilebilir. Bu durum ise bir hayvan türünden diğerine, aynı türden hayvanlar arasında ve aynı ilacın farmasötik şekli ile uygulama yollarına göre önemli derecede değişebilir (14).

Tilmikosin sığır ve koyunlar için güvenli bir ilaç olmasına rağmen keçi ve atlarda zehirli olduğu için kullanılmaması gereken bir ilaçtır (6, 9, 13). Türkiye'de ruhsatlı 30'dan fazla tilmikosin içeren müstahzar bulunmaktadır. Bu ilaçların hiçbirinin prospektüsünde keçilerde kullanılabileceğine dair kayıt yoktur; kullanılırsa etiket-dışı kullanım olur ve tüm sorumluluk uygulayana ve uygulatana aittir (4). Keçilerde tilmikosinin deri altı ve damar içi uygulanması sonucu oluşan zehirlenme olayları bildirilmiştir (3). Ancak bu olgulara ilgili analiz verileri bildirilmemiş olduğundan çalışmadaki veriler ile karşılaştırma yapılamamıştır.

Ölen keçilerin genç olması yaşlı olanların tilmikosin uygulaması sonucu ölmemesi dozun keçiler için zehirlenmeye sebep olabilecek doz olmadığını ancak genç hayvanlarda bu dozun zehirlenmeye neden olduğunu ya da genç hayvanlara vücut ağırlığı dikkate alınmadan doz uygulandığını göstermektedir.

Keleş ve ark.(10) tavuklara 50 mg/kg dozda ağızdan vererek yaptıkları farmakokinetik çalışmada tilmikosinin en yüksek yoğunluğunu 5.34±0.27 mg/kg olarak 12. saatte karaciğerde tespit etmişlerdir. Çalışmada da, bu çalışma ile uyumlu olarak en yüksek yoğunluk karaciğerde bulunmuştur. Ancak tavuk karaciğerinde bildirilen miktar, bizim keçi karaciğerinde tespit ettiğimiz 21.8 mg/kg'ın çok altındadır.

Arooba (5), koyunlara tilmikosini 10 mg/kg tek doz deri altı ve damar içi yolla uygulayarak dokularda ve sütteki farmakokinetik parametrelerini incelemiştir. Damar içi uygulamadan 3 gün sonra karaciğerde 5.89 mg/kg, böbrekte 7.99 mg/kg; 5 gün sonra karaciğerde 4.10 mg/kg, böbrekte 3.24 mg/kg; 14 gün sonra karaciğerde 1.12 mg/kg, böbrekte 1.12 mg/kg olarak kalıntı tespit etmiştir. Deri altı uygulamadan 3 gün sonra karaciğerde 9.87 mg/kg, böbrekte 24.18 mg/kg; 7 gün sonra karaciğerde 5.90 mg/kg, böbrekte 4.55 mg/kg; 21 gün sonra karaciğerde 4.18 mg/kg, böbrekte 2.12 mg/kg; 28 gün sonra karaciğerde 2.45 mg/kg, böbrekte 0.45 mg/kg olarak kalıntı tespit etmiştir. Bu çalışmalarda bulunan sonuçlar, çalışmada keçi karaciğerinde tespit edilen 21.8 mg/kg'ın çok altındadır. Buna karşın çalışmada böbrekte tespit edilen 12.0 mg/kg, deri altı yolla uygulamadan 3 gün sonra tespit edilen 24.18 mg/kg'ın çok altında olup diğer günlerde tespit edilen yoğunluğun üzerindedir.

Tokat ili Reşadiye ilçesinde meydana gelen keçi ölümlerinin belirlenmesi için gönderilen keçi iç organ numunelerinde keçilerde zehirli olduğu için uygulanmaması gereken tilmikosinin yüksek yoğunlukta tespit edilmesi, keçi ölümlerinin tilmikosinden ileri geldiğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. **Anonim** (1996) *Tilmicosin: Summary Report (1) – Committee for Veterinary Medicinal Products*. Erişim: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015577.pdf. Erişim tarihi: 19.03.2012.
2. **Anonim** (1999) *Tilmicosin (pigs and sheep tissues): Summary Report (2) – Committee for Veterinary Medicinal Products*. Erişim: http://www.ema.europa.eu/docs/ en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015584.pdf. Erişim tarihi: 19.03.2012.
3. **Anonim** (2007) *Macrolides (Veterinary Systemic)*. Erişim: http://vetmed.tamu.edu/common/docs/public/aavpt/macrolides.pdf. Erişim tarihi: 19.03.2012.
4. **Anonim** (2011) *Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü. Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik (2011/20 sayılı)*. 24.12.2011 tarih ve 28152 sayılı RG.
5. **Arooba, M.S.I.** (2011) *Pharmacokinetics and tissue and milk disposition of tilmicosin in sheep after single administrations.* J. of University of Anbar for Pure Science, 5: 1.
6. **Dawson, L., Allen, J., Olcott, B.** (2004) *Meat goat herd health-procedures and prevention.* Erişim: http://www.luresext.edu/goats/training/health1.pdf. Erişim tarihi: 26.07.2012.
7. **Granelli, K., Elgerud, C., Lundström, A., Ohlsson, A., Sjöberg, P.** (2009) *Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromotography-tandem mass spectrometry.* Anal. Chim. Acta., 637: 87-91.
8. **Kaya, S.** (1997) *Makrolidler.* 343–349. Alınmıştır: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Editörler: Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. Medisan Yayınevi, Ankara.
9. **Kaya, S.** (2002) *Veteriner Hekimliği İlaçları.* 671–702. Alınmıştır: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Editörler: Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. Medisan Yayınevi, Ankara.
10. **Keleş, O., Bakırel, T., Şener, S., Baktır, G., Dağoğlu, G., Özkan, O.** (2001) *Tavuklarda tilmikosinin farmakokinetiği ve dokulardaki düzeyleri.* Türk J. Vet. Anim. Sci., 25: 629–634.

11. **Mills, P.A.** (1959) *Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography*. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 42: 734-740.

12. **Pelosi, P., Stefanelli, P., Attard Barbini, D., Generalli, T., Amendola, G., Girolimetti, S., Vanni, F., Di Muccio, A.** (2002) *Methods for organochlorine, organophosphorus, pyrethroid and carbamate pesticide residues in foods of animal origin*. The Italian National Reference Laboratory (Pesticide Residues Section of the ISS-Istituto Superiore di Sanita (National Institute of Health)- Roma.

13. **Scharko, P.** (2004) *Medications commonly used in goats*. Erişim: http://www.uky.edu/Ag/AnimalSciences/goats/presentation/drugwithdrawtimeJan05.pdf. Erişim tarihi: 26.07.2012.

14. **Şanlı, Y.** (1994) *İlaçların Etkileri.* 71–109. Alınmıştır: Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri. Editörler: Şanlı, Y., Kaya, S. Medisan Yayınevi, Ankara.

15. **Yazar, E., Altunok V., Elmas, M., Traş, B., Baş, A.L., Özdemir, V.** (2001) *Effect of tilmicosin on cardiac muscle and serum creatine kinases activities and serum total protein level in healthy male Balb/ C mice.* Revue Méd. Vét, 152: 881–883.

16. **Zhang, Y., Jiang, H., Jin, X., Shen, Z., Shen, J., Fu, C., Guo, J.** (2004) *Residue depletion of tilmicosin in chicken tissues.* J. Agric. Food Chem., 52: 2602–2605.

Yazışma Adresi:

Dr. Yasemin COŞKUN
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Toksikoloji Bölümü
35040 Bornova / İZMİR
E-posta: yasemincoskun71@gmail.com

BORNOVA VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI

1. Dergi, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nün bilimsel yayın organı olup, yılda bir kez yayınlanır. Derginin kısaltılmış adı Bornova Vet. Bil. Derg.'dir.
2. Dergide, Türkçe ve yabancı dilde (tercihen ingilizce) hazırlanmış, tamamı yada bir kısmı daha önce başka bir yerde yayınlanmamış olan Veteriner Hekimlikle ilgili orijinal bilimsel araştırmalar, derlemeler, gözlemler ve Enstitü çalışmaları ile ilgili bilgiler yayımlanır. Derleme şeklindeki yazılar, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi ve klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir.
3. Yazılar A-4 (210x297 mm) formunda beyaz kağıda, çift aralıklı, kağıdın üstünden ve soldan 2,5 cm, sağdan ve alttan 2 cm boşluk bırakılarak ve 12 pt kullanılarak yazılmalıdır. Yazılar şekil ve tablolar dahil olmak üzere, orijinal makalelerde 15, derlemelerde 10 ve gözlemlerde 5 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, Microsoft Word programında yazılmalı ve orjinalinin yanı sıra iki adet kopyası ve disketi ile birlikte gönderilmelidir. Kopyalarda yazar adı ve yazara ait bilgiler bulunmamalıdır.
5. Tablo, şekil ve grafikler: Her tablo, şekil ve grafik, başlık ve dipnotları ile birlikte ayrı bir sayfaya çift aralıklı olarak ve rakam ile örnekteki gibi (Tablo 1, Tablo 2.....) metinde geçtiği sıraya göre yazılmalıdır. Tablolar mutlaka Word programında tablo eklentisi içinde yazılarak makale disketi içinde bulunmalıdır. Fotoğraflar siyah-beyaz, net ve parlak fotoğraf kağıdına basılmış olmalı (9 x 13 cm) yada bilgisayarda JPG, TIFF ve GIF formatında hazırlanmış şekli gönderilmelidir. Renkli fotoğraflar ve fotokopileri kabul edilmez.
6. Orijinal araştırma çalışmaları, konu başlığı, yabancı dilde başlık, yazar / yazarların adları, Türkçe özet ve anahtar kelimeler, yabancı dilde özet ve anahtar kelimeler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. Ayrıca metnin sonuna sayfa üst bilgisi için konuyu açıklayıcı birkaç kelimeden ibaret kısa bir başlık belirtilmelidir. Yabancı dilde yapılacak yayınlarda da aynı sıra takip edilmelidir.
7. **Konu başlığı**, kısa ve açık olmalı ve büyük harflerle Türkçe ve İngilizce olarak yazılmalıdır.
8. Yazar / yazarların ad ve soyadları, ünvan belirtilmeksizin yazılmalı ve yazar soyadlarına konacak rakamlar ile yazarların ünvanları, çalıştıkları kurum adresleri ve makale hakkında notlar birinci sayfanın en altında dipnot olarak belirtilmelidir.
9. **Özet,** Türkçe ve yabancı dilden 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalı ve alt kısımlarına Türkçe ve yabancı dilden anahtar kelimeler yazılmalıdır.
10. **Giriş** bölümünde çalışma ile doğrudan ilgili kısa literatür bilgiler verildikten sonra, son paragrafta çalışmanın amacı vurgulanmalıdır.
11. **Materyal ve Metot** bölümünde materyallerin nasıl ve ne şekilde toplandığı ve saklandığı ayrıntılı olarak yazılmalıdır. Bu bölümde, bilinen klasik metotlar için gereksiz ayrıntıya girmeden öz ve anlaşılır biçimde bilgi verilmeli, yeni yöntemler ise ayrıntılı şekilde açıklanmalıdır.
12. **Bulgular** araştırmanın niteliğine göre mantıklı bir sıra içinde verilmeli ve kısa bir şekilde açıklanmalıdır.
13. **Tartışma ve Sonuç** bölümünde veriler, konuyla ilgili diğer kaynaklardaki bulgular ile karşılaştırılmalı ve yorumlanmalıdır.
14. **Kaynaklar** bölümünde, yazı içinde yer alan tüm kaynaklar alfabetik sıraya göre yazılmalıdır. Metin içerisinde her kaynağa ait numara, ilgili olan cümlenin sonunda parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak yazımında yazar adları kalın, yayın adı italik yazı karakteri ile

yazılmalıdır. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır.

Süreli Yayın:

Alterkuse, S.F., **Hunt, J.M.**, **Telleffson, L.K.**, **Madden, J.M.** (1995) *Food and animal sources of human Campylobacter jejuni infection*. J.A.V.M.A., 204 (1): 57-61.

Yazarlı kitap:
Stahr, H.M. (1977) *Analytical Toxicology Methods Manuel.* pp: 39-46. Iowa State Univ. Press, Ames, USA.

Editörlü Kitap:
Editörlü kitapta bölüm (önce yazar / yazarlar, alındığı bölüm ve sayfalar, daha sonra editör, alındığı kitap adı ,basımevi ve basımyeri) yazılmalıdır.

Popoff, **M.** (1984) *Aeromonas*. pp: 545 –546. In: Krieg, M.R., Holt, J. G. (Eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore, London.

Kongre bildirisi:
Entrala, E., Mascaro, C. (1994) *New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts.* Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, İzmir, Turkey.

Tez:
Türe, O. (1991) *Studies on the viral proteins of infectious bursal disease viruses*. Doktora Tezi, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.

15. Son sayfada yazara ve araştırmaya yardımcı olan kişi ve kuruluşlara ilişkin bilgiler ve teşekkür yazıları yer alabilir.
16. Gönderilen makalelere tüm yazarlar tarafından imzalanmış Telif Hakkı Devir Sözleşmesi eklenmelidir.
17. Hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda Etik Kurul Onayı aranır.
18. Dergide yayımlanan makaleler ile ilgili her türlü sorumluluk yazarlarına aittir. Yayın kurulunun yayınla ilgili kararı yazara/yazarlara bildirilir. Yayınlanması uygun olmayan yazılar yazara/yazarlara iade edilmez
19. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

GUIDELINES FOR THE JOURNAL OF BORNOVA VETERINARY SCIENCE

1. This journal is the scientific publication of the Izmir/Bornova Veterinary Control Institute Directorate which is published once a year. The designation of the journal is J. Bornova Vet. Sci.
2. In the journal, original scientific research papers, review articles, and case reports related to Veterinary Medicine and information related to the activities of the institute which are written in Turkish or in a foreign language (preferably in English) are published. The manuscripts, in part or as a whole should not have been previously published elsewhere. The review articles are accepted for publication only if they are original and consists of the latest developments and are not the repetition of the classical information.
3. The manuscripts should be written on a A4 type (210x297mm) white paper using double space and 12 pt letters. The margins should be as follows: 2.5cm from the top and the left side and 2 cm from the right side and the bottom of the page. Including the figures and the tables, the manuscripts should not exceed 15 pages for the original articles, 10 pages for reviews and 5 pages for the case reports.
4. The manuscripts should be written in Microsoft Word program and submitted one original and two copies along with a diskette that has the manuscript. The copies should not include the name of the author and any other information related to the author.
5. Tables, figures and graphs: Each table, figure and graph, along with their legends and footnotes should be written with double space as shown in the example (Table 1, Table 2) on a separate sheet according to the sequence they were used in the text. The tables must be prepared in table format of the Word program and should be included in the manuscript diskette. The photographs should be black and white and printed on a high quality glazed paper (9x13) or the JPG, TIFF and GIF formatted computer preparations should be sent. Color prints of the photographs or their copies are not accepted.
6. Original research papers; the title of the article in Turkish and in a foreign language, author/authors' names, summary in Turkish, keywords, summary in English and keywords, introduction, materials and methods, discussion and results, references should be prepared in this order. Also a short title describing the subject should be given at the end of the article for a running head at the top of the page. The same order should be followed in manuscripts that will be published in a foreign language.
7. **Title of the article**: It should be short, clear and written with capital letters in Turkish and in English.
8. The names of the author/authors should be written without mentioning their academic degrees. The academic degrees of the authors, the affiliations and work addresses and the notes about the article should be indicated as a footnote at the bottom of the first page by pointing the last name of the authors with different numbers.
9. **Summary:** It should be prepared in Turkish and in English and should not be more than 200 words. The keywords should be included at the end, both in Turkish and in English.
10. **Introduction:** In this section, a short literature information directly related to the work should be given and the objectives of the study should be emphasized at the last paragraph.
11. **Materials and Methods:** In this section, detailed information on how the materials were collected and stored should be written. The commonly used classical methods should be stated briefly and clearly without giving detailed information, however the new techniques should be described in detail.

12. **Results:** According to the nature of the research, the results should be presented in logical order and should be explained briefly.
13. **Discussion and Conclusion:** In this section, the data should be compared with the results of the other references related to the subject and interpreted accordingly.
14. **References:** The references that are cited in the text should be listed in alphabetical order. In the text, the number belonging to each reference should be cited in paranthesis at the end of the sentence. While forming the reference list, the names of the authors should be written in bold and the name of the reference in *italic* characters. For the designations of the journals, the latest eddition of the Periodical Title Abbreviations; By Abbreviation should be referred.

Periodicals:
Alterkuse, S.F., Hunt, J.M., Tellefson, L.K., Madden, J.M. (1995) *Food and animal sources of human Campylobacter jejuni infection.* J.A.V.M.A., 204 (1): 57-61.

Book with Author:
Stahr, H.M. (1977) *Analytical Toxicology Methods Manuel*. pp: 39-46. Iowa State Univ. Press, Ames,USA.

Book with Editor:
In books with editor, the author/authors, the section and the pages that the information is taken, the editor, the book that this section belongs to, the publisher and the place to be printed should be written.

Popoff, M. (1984) *Aeromonas.* pp: 545-546. In: Krieg, M.R., Holt, J.G. (Eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore, London.

Congress Papers:
Entrala, E., Mascaro, C. (1994) *New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts.* Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, Izmir, Turkey.

Thesis:
Türe, O. (1991) *Studies on the viral proteins of infectious bursal disease viruses*. Ph.D. Thesis, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.

15. Information and acknowledgements related to the people and institutions that helped to the author and to research can take place at the last page.
16. The papers must be submitted with a Copright Release Form signed by all authors
17. The scientific articles on animals must be submitted with an Ethic Committee approval.
18. All responsibilities on the papers published in the journal belong to the authors. The decision of the editorial board is notified to the author of the manuscripts. The papers that were not approved for publication are not returned to the author.
19. Copright fee is not paid to authors.

TELİF HAKKI DEVİR SÖZLEŞMESİ

Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi

Makalenin Başlığı: .....

.....

.....

Yazar/Yazarlar ve tam isimleri: .....

.....

.....

.....

Yayından sorumlu yazarın adı-soyadı, adresi ve iletişim bilgileri: .....

.....

.....

.....

.....

Biz aşağıda ad-soyad ve imzaları bulunan yazarlar, yukarıda başlığı belirtilen makalemizin tarafımızdan yapılmış özgün bir çalışma olduğunu, başka bir dergide yayınlanmadığını ve yayına sunulmadığını, bütün yazarların gönderilen makaleyi gördüğünü garanti ederiz ve makalenin tüm sorumluluğunu üstleniriz.

Aşağıdaki maddelerde belirtilen haklarımız saklı kalmak kaydı ile makalenin telif hakkını Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ve imza ederiz.

a) Telif hakkı dışındaki patent hakları,
b) Yazarların ders, kitap gibi çalışmalarında, sözlü sunumlarında ve konferanslarında makaleyi ücret ödemeksizin kullanabilmeleri,
c) Satış amaçlı olmayan kendi faaliyetleri için makaleyi çoğaltmaları.

Bu belge tüm yazarlar tarafından imzalanmalıdır. Belgenin bağımsız kopyaları farklı kuruluşlarda bulunan yazarlar tarafından imzalanabilir. Fakat tüm imzalar özgün olmalıdır.

Yazarların Adı-Soyadı İmza Tarih

.....

.....

.....

.....

.....

Copyright Release
Journal of Bornova Veterinary Science

Manuscript title: .....

.....

.....

Full names of all authors: .....

.....

.....

Name, address and contact information of corresponding author: .....

.....

.....

.....

We, the undersigned author/authors, warrant that the manuscript with the above mentioned title is an original work, has not been previously published and is not being submitted for publishing elsewhere, and that all authors have seen and approved the manuscript as submitted. We, all authors participated in the work, accept responsibility for releasing the work.

We, the undersigned author/authors, stipulate and sign that coprigth of the above mentioned manuscript is transferred to Journal of Bornova Veterinary Science, effective on acceptance for publishing, except for all proprietary rights other than copyright, such as

a) patent rights,
b) to use, free of charge, this article for the author's future works in books, lectures or oral presentations,
c) the right to reproduce the article for their own purposes, provided that the copies are not offered for sale.

This copyright form must be signed by all authors. Separate copies of the form may be submitted by authors located at different institutions. However, all signatures must be original.

Authors Name and Surname Signature Date

.....

.....

.....

.....

.....

DANIŞMA KURULU/ADVISORY BOARD

Prof. Dr. Ferda AKAR, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Yılmaz AKÇA, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Kamil BOSTAN, İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN, Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Tayfun ÇARLI, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Meltem ÇETİN, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Bilal DİK, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hasan EREN, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ülker EREN, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hüdaverdi ERER, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. İrfan EROL, Ankara Üniversitesi,Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ulvi Reha FİDANCI, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ergun Ömer GÖKSOY, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Uğur GÜNŞEN, Balıkesir Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksek Okulu
Prof. Dr. Merih HAZIROĞLU, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Rıfkı HAZIROĞLU, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Zafer KARAER, Ankara Üniversitesi,Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Sezai KAYA, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Kamil ÖCAL, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Aytekin ÖZER, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Edip ÖZER, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayhan ÖZKUL, Ankara Üniversitesi,Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU, Mehmet Akif Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Şinasi UMUR, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Sibel YAVRU, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Enstitümüz Uzmanları Danışma Kurulunun diğer üyeleridir.

∗İsimler soyadına göre alfabetik sırayla yazılmıştır.