

ISSN 1016-3573



**ETLİK MERKEZ VETERİNER KONTROL ve
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ANKARA**



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

**THE JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY**

Cilt/Volume 18 ♦ Sayı/Number 1-2 ♦ 2007

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 18 ♦ Sayı/Number 1-2 ♦ 2007
The Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Altı ayda bir yayımlanır / Published six monthly
ISSN 1016-3573

Enstitü Adına Sahibi

Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına
Dr. Nahit YAZICIOĞLU
Enstitü Müdürü

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editör-in Chief*
Dr. Nahit YAZICIOĞLU

Editör Yardımcıları / Co-Editors

Dr. Erhan AKÇAY
Dr. Rauf AKKAYA
Uzm. Yıldız AYAZ
Dr. Asiye DAKMAN
Dr. Arife ERTÜRK
Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN
Dr. Vildan ÖZDEMİR
Dr. Armağan Erdem ÜTÜK
Dr. Yavuz ULUSOY
M.Sc. Mehmet Kadri YAVUZ

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Prof.Dr. Nejat AYDIN
Prof.Dr. Osman KUTSAL
Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Prof.Dr. Tevhide SEL

Adres / Address

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
06020 Etlik – Ankara / TÜRKİYE
Tel : 0 (312) 326 00 90 (10 hat)
Faks : 0 (312) 321 17 55
Web : www.etlikvet.gov.tr
E-mail: ehh.o@tr.net / ehh.o@etlikvet.gov.tr

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

Tasarım ve Baskı



MEDİSAN

Yaymevi, Tıbbi Alet, İlaç Kimy.Mad.
Gıda Sanayi İç ve Tış Tic. Ltd.Şti.
Tel: (0312) 311 24 26 – 311 00 57

İÇİNDEKİLER (CONTENTS)

SAYFA
(PAGE)

<p>Şanlıurfa Balıklıgöl balıklarından <i>Aeromonas hydrophila</i> izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanması <i>Aeromonas hydrophila isolation from Balıklıgöl fishes, Sanliurfa and determination of their antibiotic susceptibility</i></p> <p>O. Yaşar TEL, Gülşahen İRGARE, Murat KARAHAN, Oktay KESKİN.....1-4</p>	1-4
<p>Köpek gençlik hastalığı virusunun prevalansı ve seroepidemiolojisi <i>Canine Distemper Virus Prevalence and Seroepidemiology</i></p> <p>Elvin ÇALIŞKAN, İbrahim BURGU.....5-10</p>	5-10
<p>Koyun kan serumları ve fetuslarının bakteriyel atık etkenleri yönünden incelenmesi <i>Investigation of sheep sera and fetuses for the identification of abortifacient bacterial agents</i></p> <p>Uğur KÜÇÜKAYAN, Asiye DAKMAN, Ufuk ÜLKER, Kaan MÜŞTAK.....11-16</p>	11-16
<p>Kıymada mikroskopik muayene ile yabancı doku tesbiti üzerine deneysel çalışma <i>Experimental study on tissue detection by microscopical examination in minced meat</i></p> <p>Yıldız AYAZ, Ertan ORUÇ, Yavuz ULUSOY, Yusuf Ziya KAPLAN, Mihriban AKSOY, Adnan ÖZTÜRK, Orhan DUDAKLI17-20</p>	17-20
<p>Metil Parathion'un sıçanların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve E'nin koruyucu rolü <i>Effect of Methyl Parathion on the Rat Small Intestine Tissue and Protective Role of Vitamin C and E</i></p> <p>Ayşe ÖĞÜTCÜ, Yavuz ULUSOY, Kevser KAHRAMAN, Meltem UZUNHİSARCIKLI, Fatma Gökçe UZUN, Hakkı TAŞTAN21-26</p>	21-26
<p>Antifriz Proteinler <i>Antifreeze Proteins</i></p> <p>Gizem Işıl BEKTAŞ, Arif ALTINTAŞ27-32</p>	27-32
<p>Toll benzeri reseptörler <i>Toll like receptors</i></p> <p>Hamit Kaan MÜŞTAK, Ömer M. ESENDAL33-38</p>	33-38

Şanlıurfa Balıklıgöl balıklarından *Aeromonas hydrophila* izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanması

O. Yaşar TEL¹, Gülşahen İRGARE², Murat KARAHAN³, Oktay KESKİN¹

¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir, Şanlıurfa; ² Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi öğrencisi Yenişehir, Şanlıurfa; ³ Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Özet: Bu çalışmada, üzerinde deri lezyonu bulunan Balıklıgöl balıklarında *Aeromonas hydrophila* tespiti yapıp, antibiyotik duyarlılıkları araştırıldı. Çalışma kapsamında tesadüfi olarak seçilen 20 adet balık incelendi. İncelenen balıklardan alınan swapların yapılan laboratuvar muayenesi sonucunda üreyen kolonilerden *Aeromonas hydrophila* izole edildi. İzole edilen etkenlerin yapılan antibiyogramı sonucunda, genel olarak sefoperazon/sulbaktam, sefuroksim ve kanamisin/sefaleksine duyarlı bulunurken, kloksasilin, ampisilin, streptomisin, amoksisilin/kalvulanik asit, danofloksasin, ampisilin/sulbaktam, amikain, eritromisin ve oksitetrasikline dirençli olduğu saptandı.

Anahtar sözcükler: *Aeromonas hydrophila*, balık, antibiyotik dirençlilik

Aeromonas hydrophila isolation from Balıklıgöl fishes, Sanliurfa and determination of their antibiotic susceptibility

Summary: The objectives of this study were to identify the etiological agent of fishes with skin lesion and determine antibiotic susceptibility. For this purpose, twenty fishes were randomly selected. In the laboratory examination; *Aeromonas hydrophila* was isolated from the swab samples. According to antibiogram results; the agents were generally susceptible to cephoperazone/sulbactam, cefuroxime and kanamycine/cephalexine and resistant to cloxacillin, ampicilline, streptomycin, amoxicillin/clavulanic acid, danofloxacin, ampicilline/sulbactam, amikain, erythromycin and oxytetracycline.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, fish, antibiotic resistance.

Giriş

Aeromonas hydrophila, Vibrionaceae familyasına ait, fakültatif anaerobik Gram negatif, çomak şeklinde, özellikle su ortamlarında bulunan bir bakteridir. *A.hydrophila*'nın genel özellikleri; polar flagellalı ve hareketli olması, glikozu fermentatif ve oksidatif olarak metabolize edebilmesi, oksidaz ve katalaz pozitif olması ve amilaz, proteaz, fosfolipaz ve DNase gibi ekzoenzimleri üretebilmesidir (1). *Aeromonas* cinsi sıcaklık gereksinimine ve hareketlilik özelliklerine göre *A.hydrophila* grubu (*A. hydrophila*, *A.caviae* ve *A.sobria*) ve *A.salmonicida* (*A.salmonicida* ve alt türleri) grubu olarak ikiye ayrılmaktadır. Buna göre *A.hydrophila* grubu hareketli olup 37°C 'da gelişebilirken; *A.salmonicida* grubu hareketsiz olup 37°C 'da gelişmemektedir. Bu nedenle *A.hydrophila* grubu genellikle "hareketli" veya "mezofilik" *Aeromonas* 'lar olarak da adlandırılmaktadır (9,22).

Hareketli *Aeromonas* 'lar, tatlı ve tuzlu su kaynaklarında, kanalizasyon sularında ve çevrede yaygın olarak bulunan, suda yaşayan canlılar ve balık-

larda hastalık oluşturan fırsatçı bakterilerdir (4, 5, 17). Etken, balıklarda, olumsuz çevre koşullarında hastalığa neden olmaktadır (15,17). *A.hydrophila*, balıklarda deri lezyonları, ülserasyonlar, hemorajiler ve doku yıkımlarıyla beraber, karaciğer ve böbrek nekrozları ile karakterize hemorajik septisemi hastalığına neden olur (12,16). *A.hydrophila*, insanlarda ise, gastroenteritis, septisemi, pnömoni ve menenjit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır (14,20). Özellikle su veya toprak ile direkt temasın söz konusu olduğu yaralanmalarda, sağlıklı bireylerde enfeksiyon sadece yaralanmış bölge ile sınırlı kalırken; bağışıklık sistemi zayıf veya hasta bireylerde septisemi şeklinde görülmekte, hatta bazen ölüme bile neden olabilmektedir (3,13).

Bu çalışmada Şanlıurfa'nın simgesi Balıklıgöl'de bulunan ve deri lezyonları saptanan balıklardan etken tespitinin yapılması ve bu etkenlere yönelik uygun antibiyotiklerin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada tesadüfi olarak seçilen, toplam 20 adet sazan balığı (*Cyprinus carpio*) incelendi. Deride toplu iğne başı şeklinde yaygın hemoraji alanları görülen balıklar kepçe yardımı ile yakalandıktan sonra, lezyonların bulunduğu yerlerden svaplar alınarak soğuk zincirde en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

Laboratuara getirilen svapların Triptic Soy Agar (TSA,), Kanlı Agar (KA) ve McConkey Agara (MCA) ekimleri yapıldı. İki seri halinde ekimi yapılan petrilere 37°C ve 21°C'de 48-72 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Ayrıca mikotik enfeksiyonlar için Sabouraud Dekstroz Agara (SDA) ekimleri gerçekleştirildi. Mikotik enfeksiyonlar için besiyerleri 25°C'lik etüvde 2 hafta süreyle inkube edildi.

İnkubasyon sonucunda saf üreyen şüpheli koloniler, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri gözönüne alınarak identifikasyonları gerçekleştirildi. Saf kültürlerin Gram reaksiyonu, hareketlilik gibi özelliklerinin yanında, kolonilerin görünümü, pigmentasyonu, şekli büyüklüğü gibi kültürel özellikleri ve ayrıca oksidaz, katalaz, glikoz, O/F testi ve McConkey 'de üreme gibi biyokimyasal özellikleri tespit edildi (11). Ayrıca izole edilen *A. hydrophila* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlendi (17).

Sonuç

Kültür sonucunda alınan tüm svaplardan gerek 37°C'de gerekse 21°C'de etken üremesi görüldü. Saf olarak üreyen şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak yapılan değerlendirmede etkenin *A. hydrophila* olduğu belirlendi. Bakteriyskopide Gram negatif, tek ya da çiftler halinde, çomak bakteriler görüldü. Hareket muayenesinde etkenlerin hareketli olduğu saptandı. Etken TSA'da beyaz-krem renğinde yuvarlak koloniler oluştururken, kanlı agarda düz grimsi hemolitik koloniler oluşturdu. Kolonilerin biyokimyasal testleri Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'den yararlanılarak yapıldı (11) (Tablo 1). Mikolojik muayene sonucunda herhangi bir patojen mantar saptanmadı.

İzole edilen *A. hydrophila* suşlarının tamamı (%100) sefoperazon/sulbaktam, Sefuroksim ve kanamisin/sefaleksim'e duyarlı bulundu. Tüm

suşların ise kloksasilin, ampisilin, streptomisin, amoksisilin/klavulanik asit, danofloksasin, ampisilin/sulbaktam, amikain, eritromisin ve oksitetrasikline dirençli olduğu saptandı.

Tablo 1. *A. hydrophila*'nin biyokimyasal özellikleri
Table 1. *A. hydrophila*'s biochemical characteristics.

Test	Sonuç	Bergey's Manual
Gram boyama	(-)	(-)
Morfoloji	Çomak	Çomak
Hareket	+	+
Kanlı agarda hemoliz	+	+
Mc Conkey agarda üreme	+	+
Üre	-	-
İndol	+	+
Oksidaz	+	+
Katalaz	+	+
Metil Red	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Sitrat testi	+	d
H ₂ S	+	+
Oksidasyon/fermantasyon	F	F
Gaz oluşumu	+	+
Jelatin hidrolizi	+	+
Glukoz	+	+
İnositol	-	-
Mannitol	+	+
Arabinoz	+	+
Mannoz	+	d
Raffinoz	-	-
Sorbitol	-	d
Sukroz	+	+
Maltoz	+	+

Tartışma

Son yıllarda *A. hydrophila* üzerinde yoğunlaşan ilgiyle beraber bu organizmanın potansiyel kaynakları da araştırılmaya başlanmıştır. Bu organizmanın tatlı sulardan, deniz sularından, klorlanmış ve klorlanmamış içme sularından, çeşitli deniz kabuklularından, balıklardan, etlerden, sebzelerden, çiğ süt ve süt ürünlerinden, gaitadan ve çeşitli hastalardan izole edilebildiğine dair raporlar mevcuttur (8). *A. hydrophila*, balıkların deri lezyon ve ülserlerinden

sıklıkla izole edilmektedir (2,16). Etken, genellikle sekonder olarak infeksiyonlara neden olan fakültatif fırsatçı bir patojendir. Kötü beslenme, oksijen yetersizliği gibi konakçı direncini azaltan faktörlerin bulunması durumunda etken infeksiyonlara neden olmaktadır (16). Balıklıgöl alan olarak incelendiğinde göldeki balıkların düzensiz beslendiği, göl suyunda kirlilik olduğu, birim alanda çok sayıda balık bulunduğu, bu nedenle stres ve oksijen yetersizliği şekillendiği ve bunun da hastalığa predispozisyon yarattığı saptandı.

Yapılan çalışmada deri lezyonu saptanan balıklardan izole edilen bakterilerin *A. hydrophila* olduğu saptandı. Filipinler’de yapılan bir çalışmada da, nekrotik ülser ve lezyon görülen balıklardan *A. hydrophila* izole edildiği bildirilmiştir (2). Son ve ark.(21), yaptıkları bir çalışmada deri lezyonu bulunan balıklardan *A. hydrophila* izole edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, yapılan pek çok çalışmada *A. hydrophila*’nın lokal ve sistemik hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (10,16,19).

Bu çalışmada izole edilen *A. hydrophila* suşları genel olarak, sefoperazon/sulbaktam, sefuroksim ve kanamisin/sefaleksine’ye duyarlı bulundu. Kloksasilin, ampisilin, streptomisin, amoksisilin/kalvulanik asit, danofloksasin, ampisilin/sulbaktam, amikain, eritromisin ve oksitetrasiklin’e dirençli olduğu saptandı. Malezya’da yapılan bir çalışmada izole edilen *A. hydrophila* suşlarının 10 antibiyotiğe duyarlılıkları incelenmiştir. İzole edilen etkenlerin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, nalidiksik asit, streptomycin, sulfametaksazol-trimetoprim ve tetrasikline dirençli olduğu saptanmıştır (21). Malezya’da yapılan başka bir çalışmada pek çok izolatanın streptomisin, ampisilin ve eritromisine dirençli olduğu bulunmuş, ancak bütün izolatların seftazidime duyarlı olduğu saptanmıştır (18). Hatha ve ark. (10), yaptıkları çalışmada tatlı su balıklarından izole ettikleri bütün *A. hydrophila* suşlarının ampisiline, suşların büyük bölümünün ise amoksisilin, polymiksin-B ve novobiosine dirençli olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular çalışmada elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları ile benzerlik göstermekte olup, yapılan farklı çalışmalarda, *A. hydrophila*’nın pek çok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (6, 7, 18).

Sonuç olarak, Şanlıurfa’nın turistik simgesi olan Balıklıgöl’de bulunan balıklarda sürekli olarak gözlemlenen deri lezyonlarının *A. hydrophila* tara-

findan oluşturulduğu saptandı ve uygun antibiyotik tedavisi önerildi.

Kaynaklar

1. **Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Janda, J.M.** (2003): The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41:2348-2357.
2. **Alcestis, T.L, Rogelio, Q.G.** (1987): *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative disease epizootic in Laguna de Bay, Philippines. *Aquaculture.* 67:273-278.
3. **Connie, R., Mahon, M.T.** (1988): *Aeromonas hydrophila* Bacteremia. *Clin. Microbiol. Newsl.* 10:78-79.
4. **Dierckens, K.R., Vandenberghe, J., Beladjal, L., Huys, G., Mertens, J., Swings, J.** (1998): *Aeromonas hydrophila* causes ‘Black disease’ in fairy shrimps (Anostraca;Crustacea). *J. Fish Dis.* 21:113-119
5. **Doukas, V., Athanassopoulou, F., Karagouni, E., Dotsika, E.** (1998): *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. *J. Fish Dis.* 21:317-320.
6. **Fainstein, V., Weaver, S., Bodey, G.P.** (1982): In vitro Susceptibilities of *Aeromonas hydrophila* Against New antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:513-514.
7. **Fass, R.J., Barnishan, J.** (1981): In vitro susceptibilities of *Aeromonas Antimicrobial hydrophila* to 32 Antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 19:357-358.
8. **Handfield, M., Simard, P., Couillard, M., Letarte, R.** (1996): *Aeromonas hydrophila* Isolated from food and Drinking Water: Hemagglutination, Hemolysis, and Cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3459-3461.
9. **Harikrishnan, R., Balasundaram, C.** (2005): Modern trends in *Aeromonas hydrophila* Disease Management with fish. *Rev. fish. sci.* 13:281-320.
10. **Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J.** (2005): Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from raised fresh water fish. *Int. J Food Microbiol.* 98:131-134.
11. **Holt, J.G., Noel, R.K., Peter, H.A., James, T.S., Satanley, T.W.** (2000): *Bergey’s Manuel of Determinate Bacteriology.* 9. Ed. USA. Lioppincott Williams.
12. **Johnson, M.** (1993): The veterinary approach to channel catfish. In: L. Brown (ed.), *Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine*, Pergamon Press, Oxford, 249-270
13. **Lakshmanaperumalsamy, P., Thayumanavan, T., Subashkumar, R.** (2005): *Aeromonas Hydrophila*: A Re-Emerging Pathogen. In: *Marine Microbiology: Facets & Opportunities*; Ramaiah, N (Ed.), 115-119
14. **Nemetz, T.G., Shotts, E.B.** (1993): Zoonotic diseases. In: M.K. Stoskopf (ed.), *Fish Medicine*, W.B.Saunders, Philadelphia, 214-220

15. **Peters G., Faisal, M., Lang, T., Ahmed, I.** (1988): Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis. Aquat. Org.* 4:83-89.
16. **Popovic, N.T., Teskeredzic, E., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R.** (2000): *Aeromonas Hydrophila* Isolated from Wild Freshwater fish in Croatia. *Vet. Res. Commun.* 24:371-377
17. **Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C.** (2002): *Veterinary Microbiology and microbial Disease*. Blackwell publishing company. United Kingdom.
18. **Radu, S, Ahmad, N., Ling, F.H., Reza, A.** (2003): Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.* 81:261-266
19. **Rahim, Z., Sanyal, S.C., Aziz, K.M.S., Huq, M.I., Chowdhury, A.A.** (1984): Isolation of Enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:865-867.
20. **Skoll, P.J., Hudson, D.A., Simpson, J.A.** (1998): *Aeromonas hydrophila* in burn patients. *Burns.* 24:350-353.
21. **Son, R., Gusul, G., Sahilah, A.M., Zainuri, A., Raha, A.R., Salmah, I.** (1997): Antibiotic resistance and plasmid profile of *aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telepia* (*Telepia mossambica*). *Lett. Appl. Microbiol.* 24:479-482
22. **Woo, P.T.K., Bruno, D.W.** (1999): Fish diseases and Disorders, volume 3: Viral, Bacterial and fungal infections. In Aoki, T. *Motile aeromonads (Aeromonas hydrophila)*. 427-453 CAB International.

Köpek gençlik hastalığı virusunun prevalansı ve seroepidemiolojisi

Elvin ÇALIŞKAN¹, İbrahim BURGU²

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 06020 Etlik/Ankara; ² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı/ Ankara

Özet: Çalışmada, Köpek Gençlik Hastalığı ön tanısı olan 157 adet hayvandan alınan nazal, konjunktival ve rektal sürüntü, gaita, lökosit ve organ numuneleri Köpek Gençlik Hastalığı virus nükleik asit varlığı yönünden Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile test edildi. Testler sonucunda 51 hayvanda Köpek Gençlik Hastalığı virusu tespit edildi. Bu hayvanlara ait farklı klinik örnekler pozitiflik yönünden değerlendirildi. Ayrıca pozitiflik tespit edilen 47 olguya ait kan serum örnekleri IgM ve IgG varlığı yönünden incelendi. Değerlendirmeler sonucunda klinik örneklerde en yüksek pozitiflik oranının nazal sürüntü örneklerinde olduğu saptandı. Serolojik değerlendirmeler sonucunda hayvanların genelinin akut enfeksiyon döneminde olduğu belirlendi. Aşılandığı bildirilen 21 olguda ise enfeksiyonun geliştiği tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Köpek Gençlik Hastalığı, Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR), IgM, IgG, ELISA

Canine Distemper Virus Prevalence and Seroepidemiology

Summary: Nasal, conjunktival and rectal swabs, feces, leucocyte and organ samples were obtained from 157 animals clinically suspected Canine Distemper infected. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction were performed for the detection of viral nucleic acid. According to the test 51 cases were found positive. The positivity rates among different clinical samples were examined. Besides, existence of IgM and IgG in sera samples from CDV positive 47 cases were evaluated. It was found that, among clinical samples collected from CDV positive cases nasal swabs had higher viral nucleic acid detection rates than other specimens. Results obtained by ELISA IgM showed that most cases are at the acute phase. Twenty-one cases, known to be vaccinated, were found positive.

Key Words: Canine Distemper, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, IgM, IgG, ELISA

Giriş

Canine Distemper (CD) veya Köpek Gençlik Hastalığı olarak da bilinen enfeksiyon bir çok evcil ve vahşi karnivor türünde yaygın olarak görülen önemli viral enfeksiyonlar arasında yer alır (Mochizuki ve ark., 1999). Enfeksiyon dünya çapında oldukça yaygındır ve özellikle immünolojik olarak zayıf popülasyonlarda yüksek bulaşma ve ölüm oranına sahiptir. 16.yüzyıldan itibaren varlığı bilinen bu hastalığın etkeninin bir virus olduğu, ilk olarak 1906 yılında Carré tarafından tespit edilmiştir (Appel ve Summers, 1999). Köpek Gençlik Hastalığı Virus (CDV), Paramyxoviridae ailesi içinde bulunan Morbillivirus genusuna dahildir ve bu genusun diğer üyeleri ile oldukça yakın genetik ve dolayısıyla antijenik ilişkiye sahiptir (Mochizuki ve ark., 1999; von Messling ve ark., 2001). CDV' nin genetik materyali segmentsiz, tek zincirli, lineer ve negatif polariteli bir RNA molekülüdür. Viral genom uzunluğu 15.690 baz çiftidir (bp) (Sidhu ve ark., 1993b). Viral genomda toplam 6 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, Nükleokapsid Pro-

teini (N), Fosfoprotein (P), Matriks Proteini (M), Füzyon Proteini (F), Hemagglütinin Proteini (H) ve Polimeraz Proteini (L) gen bölgeleridir (Abraham ve Banerjee, 1976; Sidhu ve ark., 1993b; Whelan ve ark., 2004). H proteini CDV'nin iki yüzey proteininde biridir ve virusun hücresele reseptörlere tutunmasını sağlar. Bununla birlikte H proteini viral tropizmin ve sitopatojenitenin başlıca belirleyicisi olarak ifade edilmektedir (Haas ve ark., 1997; von Messling ve ark., 2001).

CDV' nin hedefi tüm vücutta bulunan lenfoid doku ve muköz membran hücreleridir. Viral affiniteye bağlı olarak solunum, sindirim ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları ile birlikte bazı durumlarda deri döküntüleri ve hiperkeratozun da eşlik ettiği akut, subakut ya da kronik bir enfeksiyon tablosu gelişir (Appel ve Summers, 1995; Mochizuki ve ark., 1999). CD' nin erken klinik teşhisi zordur çünkü enfeksiyonun başlıca semptomları olan burun akıntısı ve ishal diğer solunum ve sindirim enfeksiyonlarında da görülmektedir. Hastalığın teşhisi ancak ilerleyen dönemlerde ortaya çıkan

kordinasyon bozukluğu, myoklonus ve konvülsiyonlar ile karakterize sinir sistemi bulgularına dayanılarak yapılmaktadır. Enfekte hayvanlarda uygun tedavi seçeneklerinin saptanması açısından erken teşhisin büyük önemi vardır (Cho ve Park, 2005).

Bu çalışmada, farklı klinik örneklerde CDV nükleik asit varlığının araştırılması ve CD pozitif olduğu belirlenen olgulara ait kan serum örneklerinde IgM ve IgG yönünden serolojik bir değerlendirilmenin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklenen hayvanlar

Çalışmada örneklenen hayvanlar, 2004–2006 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri ve Patoloji Anabilim Dalı, özel veteriner klinikleri ve hayvan barınaklarından temin edildi. Örneklemede yüksek ateş, solunum, sindirim ve/veya sinir sistemi enfeksiyonlarına ait bulgular gösteren ya da enfeksiyon riski olan hayvanlar ile birlikte barındırılan hayvanlar kullanıldı. Bu doğrultuda CDV enfeksiyonu ön tanısı konulan çeşitli yaş grubu ve ırktan 157 adet farklı hayvandan alınan örnekler reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PZR) tabi tutuldu.

Serum örnekleri

Serolojik testlerde kullanılmak amacıyla, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri, özel veteriner klinikleri ve hayvan barınaklarından sağlanan ve CDV pozitifliği saptanan 47 olguya ait kan serum örneği kullanıldı.

Nazal ve konjunktival sürüntü örneklerinin hazırlanması

Nazal ve konjunktival sürüntü örnekleri, içerisinde Fosfat Tamponlu Tuz solüsyonu (PBS) bulunan, rayon (selüloz fiber) kaplı ticari swap çubukları (Cultiplast-LP, İtalya) kullanılarak toplandı. Laboratuvarında swap tüpleri karıştırıcı (vorteks) ile karıştırıldıktan sonra tüp içerisindeki sıvı steril tüplere alındı, +4°C' de 3000 rpm' de, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, nükleik asit varlığını araştırmak için 400µl örnek 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı.

Gaita örneklerinin hazırlanması

Gaita örnekleri, PBS ile 1/10 oranında süspanse edildi, +4°C de, 3000 rpm'de, 20 dakika santrifüj

edildikten sonra süpernatant steril bir stok tüpüne alındı. Gaita örneklerinin elde edilemediği durumlarda ise rektal sürüntü örnekleri kullanıldı. Rektal sürüntü örneklerinin hazırlanmasında nazal ve konjunktival sürüntü örneklerinde bildirilen yöntem kullanıldı. Nükleik asit varlığını araştırmak için, 400µl örnek 1.5 ml'lik bir tüpe aktarıldı.

Lökosit örneklerinin hazırlanması

EDTA içeren antikoagulanlı tüplere (Vacutainer, Almanya) alınan kan örnekleri 2000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Ayrılan lökosit tabakası içerisinde 1ml PBS bulunan steril bir tüpe aktarıldı ve 2000 rpm' de 10 dakika süre ile tekrar santrifüj edilerek lökosit yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Son yıkamada elde edilen lökosit tabakası 1ml PBS içeren steril stok tüpüne aktarıldı. Nükleik asit varlığını araştırmak için, 400 µl örnek 1.5ml'lik bir tüpe aktarıldı.

Organ örneklerinin hazırlanması

Organ örneklerinden alınan yaklaşık 1gr doku -20°C de bir kere dondurulup çözüldükten sonra homojenizatör yardımıyla (Braun, Almanya) parçalandı. Elde edilen homojenizat, +4°C de, 3000 rpm' de, 20 dakika santrifüj edildi. Organ homojenizatları steril stok tüplerine aktarıldı. Nükleik asit varlığını araştırmak için, 400µl örnek 1.5ml'lik bir tüpe aktarıldı.

Serum örneklerinin hazırlanması

Silikonlu tüplere (Greiner, Almanya) alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı takiben 3000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj ile ayrılan kan serumu, steril tüplere aktarıldı. Test aşamasına kadar -20°C de saklandı.

RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonunda Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından tanımlanan Asit Guanidin tiyosiyanat-Fenol ekstraksiyon metodu kullanıldı. Bu amaçla 400µl klinik örnek ve 400µl solüsyon D (4.2M Guanidin tiyosiyonat, 0.75M Sodyum Sitrata dihidrat, 0.33M N-Lauril sarcosin ve 360µl 2-merkaptotanol) karışımı 1.5 ml'lik tüp içerisinde bir araya getirildi ve karıştırıldı. Karışımın üzerine 300µl asit fenol (pH 4), kloroform-izoamilalkol [Ch/IsoA (49:1)] ve 100µl 3M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve homojen bir karışım elde edilene kadar 15 saniye süre ile karıştırıldı. Tüpler masaüstü santrifüjde, oda ısısında, 12000 rpm de 10 dakika

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 fazın en üst fazından 700 µl yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit hacimde -20°C'ye soğutulmuş 2-izopropanol ilave edildi ve karıştırıldı. Nükleik asit presipitasyonu için karışım en az 1 saat süre ile -80 °C de bekletildi. Süre sonunda donmuş olan karışımlar oda ısında eritildikten sonra, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken RNA pelleti, %70' lik etanol ile yıkandı ve 37°C lik etüvde kurutuldu. Kurutulan pelletler 20 µl deiyonize su (18 Mohm/cm) (Applichem, Almanya) ile çözüldü.

Reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)

Ekstraksiyon sonunda elde edilen RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla RT-PZR, Özkul ve ark. (2004) tarafından tanımlanan yöntem ile sırasıyla 10µl ve 50µl' lik hacimlerde gerçekleştirildi. İki aşamada yapılan cDNA sentezi, iki farklı karışımdan oluşan ve birbirini takip eden iki reaksiyon sonucu gerçekleştirildi. İlk basamakta, 3µl RNA, 0.5µl heksamer primer ve 3.5µl deiyonize su bileşenlerinden oluşan karışım I hazırlandı ve termal çevirici cihazda (Biometra, Almanya) ikincil RNA yapılarının açılması için, 70°C de 5 dakikalık ısı döngüsü uygulandı. Cihazdan alınan tüpler buz akülerinde soğutuldu. Bunu takiben 0,5µl MMLV reverz transkriptaz (RT), 2µl 5X RT buffer ve 1µl dNTP bileşenlerinden oluşan karışım II hazırlandı. Soğutulmuş karışım I' in üzerine karışım II' den 3.5µl eklendi ve 25°C de 5 dakika, 37°C de 1 saat ve 70°C de 5 dakika basamaklarından oluşan ısı döngüleri sonunda tek iplikli cDNA sentezi gerçekleştirildi. Takiben DNA'nın standart PZR yoluyla çoğaltılması aşamasına geçildi. H proteini gen bölgesinin kısmi amplifikasyonu amacıyla elde edilen cDNA, FF1-HR2 primer çifti ile PZR'ye tabi tutuldu. Araştırmada kullanılan primer dizinleri ve ilgili genler üzerindeki yerleşimleri Çizelge1' de sunulmuştur.

DNA amplifikasyonu için tanımlanan 50 µl lik PZR karışımı 3µl cDNA, 0,5µl Taq DNA polimeraz, 5µl 10X Taq buffer, 4µl MgCl₂ (25mM), 0,8µl dNPT (10mM), 0,8µl primer ve 35,1µl deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Termal çevirici cihazında bulunan karışım tüplerine 94°C de 4 dakikalık denatürasyon basamağını takiben 56°C de 45 saniye, 72°C de 2 dakika ve 94°C de 30 saniyelik 35 döngüden oluşan çoğaltma basamağı ve 50°C

de 1 dakika, 72°C de 10 dakikalık son uzama basamağından oluşan ısı döngüleri uygulandı. Reaksiyon sonunda agaroz jelde DNA ürünlerinin göçü sağlandı ve oluşan bantlar UV transilluminatör (Vilber Lourmat, Fransa) ve jel dokümantasyon sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) yardımı ile görüntülendi.

Çizelge 1: PZR' de kullanılan primer dizinleri, yerleşimleri ve elde edilen ürün büyüklükleri.

Primer Kodu	Dizin (5' →3')	Bölge (nt)	Ürün Büyüklüğü (bp)
CDV FF1	TCGAAATCCTATGTGAGATCACT	6897	1301
CDV HR2	GTTCTTCTGTTTCTCAGAGG	8198	

RT-PZR ile pozitif olduğu saptanan 8 olguda her iki antikorun da varlığına rastlanamadı ve bu olguların 7' sinin CD sonucunda öldüğü belirlendi. Söz konusu grup içerisinde bulunan hayvanların aşılama durumu belirtilmedi. Olguların 15' inin ise her iki antikor varlığı yönünden pozitif olduğu saptandı ancak, sonuçlar ölüm oranları düzeyinde ilişkilendirilemedi.

Anamnez kayıtlarından, 47 olgudan 21'inin CD' ye karşı aşılama durumu belirlendi. Bu olgulardan 19 unda IgM ve 12 sinde IgG varlığı tespit edilemedi. Bu grup içerisinde 12 olgunun CD sonucunda öldüğü belirlendi. 5 olguda (Olgu 8, 24, 31, 34 ve 39) her iki antikorun varlığına rağmen hastalığın ölüm ile sonuçlandığı belirlendi. 4 olguda ise hayvanların son durumlarına ait bilgi sağlanamadı.

Çizelge 2: Olgulara ait IgM ve IgG ELISA sonuçları.

Olgu No	IgM	IgG	SON DURUM
Olgu 1	-	+	Ö
Olgu 2*	+	-	Ö
Olgu 3	+	-	Ö
Olgu 4*	+	-	Y
Olgu 5*	+	+	B
Olgu 6	-	-	Ö
Olgu 7*	+	-	Ö

Olgu 8*	+	+	Ö
Olgu 9	-	-	B
Olgu 11*	-	+	Y
Olgu 12*	-	+	Y
Olgu 13*	+	-	Y
Olgu 14*	+	-	Ö
Olgu 15	-	-	Ö
Olgu 16*	+	+	B
Olgu 17*	+	+	B
Olgu 18	-	-	Ö
Olgu 19	-	-	Ö
Olgu 20	-	-	Ö
Olgu 21*	+	-	Ö
Olgu 22*	+	-	B
Olgu 23*	+	+	Ö
Olgu 24*	+	+	Ö
Olgu 25	-	+	Ö
Olgu 26	+	+	Y
Olgu 27*	+	+	Y
Olgu 28*	+	-	Ö
Olgu 29*	+	-	Ö
Olgu 30	-	-	Ö
Olgu 31*	+	+	Ö
Olgu 32	+	+	Ö
Olgu 34*	+	+	Ö
Olgu 35	+	-	Y
Olgu 36	+	+	Ö
Olgu 37	+	-	B
Olgu 38	+	-	Ö
Olgu 39*	+	+	Ö
Olgu 42	+	+	Ö
Olgu 44	+	-	B
Olgu 45	+	-	Y
Olgu 46	-	-	Ö
Olgu 47	+	+	Y

*: Aşılınmış olduğu beyan edilen olgular. Y: Yaşiyor
 Ö: Enfeksiyona bağlı ölüm B: Bilinmiyor

Tartışma

Çalışmada, faklı klinik örneklerde CDV nükleik asiti varlığı yönünden yapılan değerlendirmeler sonucunda, 45 olguya ait nazal sürüntü örneğinden 37 adedinde (%82,2), 42 adet konjunktival sürüntü örneğinden 26 adedinde (%61,9) ve 37 adet lökosit örneğinden 13 adedinde (%35,1) viral nükleik asit varlığı tespit edilmiştir. Karşılaştırma sonunda en yüksek pozitiflik oranının nazal sürüntü örneklerinde bulunduğu belirlenmiştir. Nazal sürüntü örneklerinde saptanan yüksek pozitiflik oranları ile olguların genelinde teşhis edilen solunum sistemi enfeksiyon bulgularının birbiri ile paralel oldukları görülmüştür.

Kim ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, deneysel olarak CDV ile enfekte köpeklerde, hastalığın erken tanısında RT-PZR yöntemi ile nazal ve konjunktival sürüntü, lökosit ve idrar örneklerinde viral nükleik asit varlığını değerlendirmişler ve konjunktival sürüntü örneklerinde viral nükleik asitin enfeksiyondan sonraki 1-14. günler, nazal sürüntü örneklerinde de bu sürenin 3-14. günler arasında değişen oranlarda tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Lan ve ark. (2005) yine deneysel olarak enfekte köpeklere ait nazal sürüntü örneklerinden RT-PZR yöntemi ile enfeksiyonu takiben 28. güne kadar viral nükleik asit varlığının tayin edilebileceğini ortaya koymuştur. Kim ve ark. (2006) virusun, diğer dokulara oranla, kandan daha hızlı elimine edilmesinden dolayı lökosit örneklerinde viral nükleik asit tayinin diğer klinik örneklere oranla daha zor ve riskli girişimleri gerektirdiği için de daha az pratik olduğunu vurgulamışlardır.

Humoral immün yanıt hastalıktan korumada ve iyileşme sürecinde oldukça etkilidir. (Ho ve Babiuk, 1979). Bu sebepten CDV' ye karşı gelişen antikor düzeyleri ve türünün tespiti, hayvanın immünite durumunun ve/veya aşı etkinliğinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir (Mochizuki ve ark., 2002). Çalışmada elde edilen ELISA sonuçlarına ait değerlendirmede, akut enfeksiyon varlığını gösteren IgM antikor, olguların %64' ün de tespit edilmiştir. IgG varlığının ise %41 lik bir oranda kaldığı belirlenmiştir. IgM ELISA sonuçlarına dayanılarak, olguların genelinde enfeksiyonun erken döneminde bulunduğu anlaşılmaktadır. IgM varlığı saptanan 30 olgudan, 17 sinin akut enfeksiyon dönemini atlattıkları ve enfeksiyon sonucunda öldüğü belirlenmiştir. Sekiz olguda ise her iki antikorun da varlığı-

na rastlanamamış ve bu olguların 7 sinin CD sonucunda öldüğü saptanmıştır. Aşılanmış olduğu bildirilen 21 olgudan 8 olguda ise IgG varlığı tespit edilememiştir. Bu olgulardan elde edilen sonuçlar, aşılama ile yeterli bir bağışık yanıtı ulaşılamadığını göstermektedir.

von Messling ve ark., (1999) yaptıkları çalışmada, IgM pozitif ancak IgG negatif olgulara ait lökosit örneklerinde saptanan viral nükleik asitinin sözkonusu hayvanların viremi döneminde olduğunun bir göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 6 olguya (olgu 2,3,4,7,28 ve 44) ait sonuçların von Messling ve ark., (1999) sonuçları ile paralel olduğu ve bu olguların kısa süren viremi dönemlerinde örneklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçların hastalığın erken teşhisi açısından da önem taşıdığı bilinmektedir (Lan ve ark., 2005; Amude ve ark., 2006).

Günümüzde CD'nin tek uygulanabilir ve etkili kontrol yöntemi aşı ile immünizasyondur. Hastalık, 1950' llerde kullanılan inaktif aşılarda ve takip eden 10 yıllık süreç içerisinde geliştirilen ve günümüzde de kullanılmaya devam edilen modifiye canlı aşılarda kontrol altında tutulmaya çalışılmaktadır (Chappuis, 1995). Çalışma dâhilinde aşılanmış hayvanlarda da enfeksiyonunun geliştiği belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı, CD' ye karşı aşılanmış hayvanlarda da enfeksiyon gelişebileceği için, aşılanmış hayvanların koruyucu bağışık düzeyi ifade edip etmediğinin sorgulanmalıdır. Ayrıca, aşı uygulamasında aşılama takvimine uyulması ve aşılama takvimi oluşturulurken maternal antikorların varlığının dikkate alınması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. **Abraham, G., Banerjee, A.K.** (1976). Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1504-1508.
2. **Amude, A.,M., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F.** (2006). Antemortem diagnosis of CDV infections by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Vet. Resch. Comm.*, 30: 679-687.
3. **Appel, M.J.G., Summers B.A.** (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.*, 44: 187-191.
4. **Appel, M.J.G., Summers, B.A.** (1999). Canine distemper: Current Status. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Erişim:[<http://www.ivis.com>.]
5. **Chappuis, G.** (1995). Control of canine distemper. *Vet. Microbiol.*, 44: 351-358.
6. **Cho, H.S., Park, N.Y.** (2005). Detection of Canine Distemper Virus in Blood Samples by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Vet. Med. B*, 52, 410-413.
7. **Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987). Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann. Biochem.* 162: 156-159.
8. **Haas, L., Martens, W., Greiser-Wilke, I., Mamaev, L., Butina, T., Maack, D., Barrett, T.** (1997). Analysis of hemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.*, 48: 165-171.
9. **HO, C., Babiuk, L.** (1979). Immune mechanisms against canine distemper. II role of antibody in antigen modulation and prevention of intercellular and extracellular spread of canine distemper virus. *Immunology*, 38: 765-771.
10. **Kim, D., Jeoung, Y., Ahn, J., Lee, H., Pak, S., Kwon, H.** (2006). Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (8): 877-879.
11. **Lan, N.T., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., Kai, K., Mochizuki, M., Uchida, K., Tateyama, S.** (2005c). Pathogenesis and phylogenetic analysis of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet. Microbiol.*, 110:197-207.
12. **Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., Ishiguro, S.** (1999). Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin gene of recent isolates from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2936-29423.
13. **Mochizuki, M., Motoyoshi, M. Maeda, K., Kai, K.** (2002). Complement mediated neutralization of canine distemper virus in vitro: Cross-reaction between vaccine Onderstepoort and field KDK-1 strains with different hemagglutinin gene characteristics. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9: 921-924.
14. **Özkul, A., Sancak, A., Güngör, E., Burgu, İ.** (2004). Determination and phylogenetic analysis of canine distemper virus in dogs with nervous symptoms in Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52 (1): 125-132.
15. **Sidhu, M., Husar, V., Cook, S.D., Dowling, P.C., Udem, S.A.** (1993). Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: Completion of the entire CDV genome sequence. *Virology*, 193: 66-72.
16. **von Messling, V., Harder, T., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I., Haas, L.** (1999). Rapid and sensitive detection of IgM and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein based ELISA. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1049-1056.

17. **von Messling, V., Zimmer, G., Herler, G., Haas, I., Cattaneo, R.** (2001). The Hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity . *J. Virol.* 75: 6418-6427.
18. **Whelan, S.P.J., Barr, N.J., Wertz, W.G.** (2004). Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Biology of Negative- Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics.* Springer-Verlag (Newyork). Kawaoka, Y. s: 63-111.

Koyun kan serumları ve fetuslarının bakteriyel atık etkenleri yönünden incelenmesi

Uğur KÜÇÜKAYAN¹, Asiye DAKMAN¹, Ufuk ÜLKER¹, Kaan MÜŞTAK¹

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü-Ankara

Özet: Bu çalışmada 2003–2007 yılları arasında enstitümüze gönderilen 8053 adet atık yapmış koyuna ait kan serumu serolojik, 463 adet fetus ise bakteriyolojik olarak, koyunlarda yavru atımına neden olan hastalıklar yönünden incelenmiştir.

Koyun kan serumlarından 2635'inden 395'inde (%14.99) Brucellosis'e 1746'sının 130'unda (%7.44) Campylobacteriosis'e, 1296'sının 3'ünde (%0.23) Salmonellosis'e, ve 2376'sının 43'ünde (%1.81) ise Chlamydiaosis'e karşı antikor saptanmıştır. 463 fütüsün 139'unda (%30.02) *Brucella spp.*, 6'sında (%01.29) *Campylobacter spp.* izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen 6 *Campylobacter spp.*'nin tümü *Campylobacter fetus subsp. fetus* olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçların söz konusu yıllar içerisindeki dağılımları, 1993–1997 yılları arasında yine bölümümüzde gerçekleştirilen retrospektif çalışma sonuçlarıyla karşılaştırılarak koyun atık etkenlerinin son durumları hakkında bilgi edinilmiştir.

Anahtar Sözcükler: koyun, abortus, kan serumu, seroloji, fetus, bakteriyoloji

Investigation of sheep sera and foetuses for the identification of abortifacient bacterial agents

Summary: In this study, 8053 sheep blood sera were tested serologically and 463 foetuses were examined bacteriologically between the years 2003 and 2007 for the agents causing abortion.

395 (14.99%) of 2635 sheep sera were founded antibody against to Brucellosis, 130 (7.44%) of 1746 to Campylobacteriosis, 3 (0.23%) of 1296 to Salmonellosis and 43 (1.81%) of 2376 to Chlamydiaosis. *Brucella spp.* were isolated in 139 (30.02%) foetuses, *Campylobacter spp.* were isolated from 6 (1.29%) of 463 foetuses. All isolated *Campylobacter spp.* were identified as a *Campylobacter fetus subsp. fetus*.

The distributions of the results in the years were compared with the retrospective study which was performed between 1993-1997 for gathering the latest information about the agents which cause abortion.

Key words: Sheep, abortus, blood sera, serology, fetus, bacteriology,

Giriş

Ülkemiz, 2004 yılı istatistiksel verilerine göre 25 milyon başın üzerinde koyun popülasyonuna sahiptir. Koyun yetiştiriciliği, yurt ekonomisine 60 bin ton üzerinde et üretimi ile katkı sağlasa da halen istenilen düzeye gelememiştir (DİE, 2004). Bunun başlıca nedenleri arasında koyun ırklarının ıslah edilmemiş olması, halkımızın sosyo-ekonomik durumu, koyun hastalıkları ve hastalıklardan korunma hakkındaki bilgilerin üreticiye yeterince verilmemiş olması sayılabilir. Koyun yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen enfeksiyöz karakterdeki yavru atmalar diğer hastalıklar içerisinde ekonomik açıdan önemli bir yer tutmaktadır. Yapılacak retrospektif nitelikteki çalışmalar, bu hastalıkların ülkemizdeki seyrinin anlaşılmasında ve alınacak koruyucu önlemlerin nitelik ve niceliğinin belirlenmesinde yardımcı olacağı anlaşılmıştır.

Koyunlarda yavru atmalara sebep olan etkenlerin çoğu bakteriyel orijinlidir. Bunun yanında viral, paraziter, mantar ve diğer faktörlere bağlı olarak da yavru atmalar görülmektedir. Brucellosis, Campylobacteriosis, Salmonellosis ve Chlamydiaosis koyunlarda en çok tespit edilen atık etkenlerindedir (Karaman ve Küçükayın, 2000).

Koyunlarda Brucellosis, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek aborta ve infertiliteye neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. Yavru atmalar sonucu büyük ekonomik kayıplara yol açar. Koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olan *Brucella* etkenleri *B.melitensis* ve *B.abortus*, *Brucella suis* ve Koçlarda *Brucella ovis* dir. *Brucella* türleri, Gram negatif, hareketsiz, mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Atık materyali, süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşarak zoonotik enfeksiyonlara neden olur. Yurdumuzda

B.melitensis en yaygın tür olup halen bu hastalıkla mücadele kampanyası sürdürülmektedir (Arda ve ark., 1992; Karaman ve Küçükayan, 2000).

Campylobacteriosis, sığır ve koyunlarda yavru atımı ve infertilite ile karakterize, bulaşıcı ve zoonotik bir diğer enfeksiyondur. Koyunlarda hastalığa *C.fetus* (*C.fetus subsp. veneralis* ve *C.fetus subsp. fetus*), *C.jejuni* ve *C.coli* neden olmaktadır. Etken Gram negatif, hareketli ve mikroaerofiliktir. Hastalık ilk çıktığında sürüde %60-70 oranında atık vakası görülür. Atıklar gebeliği takiben 4-5'inci aylarda görülmektedir (Arda ve ark., 1992; Karaman ve Küçükayan, 2000).

Chlamydiosis, koyunlarda placentitis, abortus, poliartritis ve konjunktivitis'lere sebep olan bulaşıcı zoonotik bir hastalıktır. Koyunlarda enzootik abortuslara neden olan etken *Chlamydiophila abortus*'tur. Etken Gram negatif, hareketsiz olup çoğalması için canlı ortamlara (kobay, doku kültürü ve embriyolu tavuk yumurtası) gereksinim duyar (Karaman ve Küçükayan, 2000).

Salmonellosis, sığır ve koyunlarda metritis ve yavru atımlarla karakterize bulaşıcı bakteriyel, zoonotik bir hastalıktır. koyunlarda *Salmonella abortus ovis* hastalığın primer etkenidir. Etken çomak şeklinde, sporsuz, kapsülsüz, Gram negatif hareketli ve aerobik bir bakteridir. Hastalığın teşhisi mikrobiyolojik ve serolojik olarak yapılmaktadır (Arda ve ark., 1992; Karaman ve Küçükayan 2000).

Bu atık etkenleri içerisinde *Brucella*, özellikle Akdeniz, Ortadoğu, Orta Asya, Arap körfez ülkeleri ve bazı Orta Amerika ülkeleri başta olmak üzere dünyada en yaygın olan zoonotik etkindir (Anon,2007). Diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de özellikle *Brucella* eradikasyon programları yürütülmektedir. Bu eradikasyon programlarının başarısının izlenebilmesi ve hastalıkla ilgili güncel durumun anlaşılabilmesi için retrospektif ve tarama çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Örneğin Konya bölgesinde yapılan bir çalışmada 303 aborte koyun fetusundan % 4.1 *B.melitensis*, %7.5 *C. fetus*, % 3.6 *S.abortus ovis* izole edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada 1022 koyun kan serumunun %22.2'si Brucellosis, %12.7'si Campylobacteriosis, %4.7'si Chlamydiosis yönünden pozitif bulunmuştur (Kenar ve ark.,1990).

Yapılan bu çalışmada elde edilen verilerin de karşılaştırılacağı, bölümümüz tarafından yapılan ve

1993-1997 yıllarını kapsayan bir retrospektif çalışmada ise 297 koyun fetusunun mikrobiyolojik muayenesi sonucu 100 adet (%33.7) *Brucella spp.*, 2 adet (%0.7) *Salmonella spp.* ve 4 adet (%1.3) *Campylobacter spp.* izolasyonu yapılmıştır. Aynı çalışmada atık yapmış koyunlara ait 12199 adet serum serolojik olarak incelenmiş ve 1909 (%15.6) adedi Brucellosis yönünden pozitif bulunmuştur. Campylobacteriosis yönünden test edilen 4017 serumdan 264'ü (%6.6), Chlamydiosis yönünden test edilen 4890 serumdan 88'i (%1.8) ve Salmonellosis yönünden test edilen 6877 serumdan 117 (%1.7)'si ise yine aynı çalışmada pozitif bulunmuştur (Karaman ve Küçükayan, 2000).

Bu çalışmada ise 2003–2007 yılları arasında değişik illerden enstitümüze gönderilen koyun kan serumlarının serolojik yönden ve aborte fütüslerin bakteriyolojik yönden incelenerek enfeksiyöz abortların yıllara göre dağılımının değerlendirilmesi ve çıkan sonuçların daha önce bölümümüz tarafından yapılmış olan, 1993–1997 yıllarını kapsayan retrospektif çalışma ile karşılaştırılarak ülkemizdeki bu enfeksiyonlara bağlı abortların yıllar içerisindeki seyirinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 2003-2007 yılları arasında bölümümüze gönderilen atık yapmış koyunlara ait 8053 adet kan serumu çeşitli serolojik testler ile Brucellosis, Campylobacteriosis, Salmonellosis ve Chlamydiosis yönünden, 463 adet aborte fetus ise Brucellosis, Campylobacteriosis ve Salmonellosis yönünden bakteriyolojik olarak incelendi.

Elde edilen verilerin yıl içerisindeki değişimlerinin ve *Brucella spp.* izolasyon oranlarının aylara göre değişiminin istatistiksel açıdan önemleri ile 1993-1997 yılları arasında yapılan diğer çalışmadan elde edilen verilerle bu çalışmadaki verilerin karşılaştırılması istatistiksel olarak Kikare testi ile değerlendirildi (Rosner, 2006).

Bakteriyolojik Muayeneler

Bakteriyoskopi; atık fetuslara ait mide içeriği ve kotiledonlardan hazırlanan preparatlar Gram ve Stamp boyama yöntemleriyle boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Kültür; atık fetusların mide içeriği, dalak, karaciğer ve kotiledonlarından bakteriyel etkenlerin

izolasyonları için çeşitli selektif ve spesifik besi yerlerine ekimler yapıldı.

Brucella türlerinin izolasyonları için atık fetusa ait mide içeriği, dalak ve karaciğerden Serum-Dekstroz agara ekim yapılarak besiyerleri, %10 CO₂ etüvde ve normal aerobik ortamda 37°C'de 4-7 gün inkubasyona bırakıldı (Alton ve Ark.,1988; Nielsen ve Duncan, 1986).

Campylobacter türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için Skirrow selektif besi yerine ve %7 defibrine koyun kanlı agara ekim yapılarak besi yerlerinin bir kısmı, %10 CO₂ etüve, bir kısmı da içinde Gas-pack (Oxoid) bulunan anaerobik jara konularak 37°C'de 3-5 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucu üreyen koloniler Gram boyama ile boyandı. Gram negatif, virgül veya S şekilli olanlara hareket muayenesi yapılarak hareketli olanlara İdentifikasyon testleri yapıldı. İdentifikasyon için oksidaz ve katalaz testi, H₂S oluşumu, hippurat hidroliz testi, 25°C ve 42°C'de üreme, Nalidiksik Asit ve Cephalothin Duyarlılık testleri yapıldı (Anon, 2000; Cowan, 1981)

Salmonella türlerinin izolasyon ve identifikasyonu içinse atık fetusa ait mide içeriği ve karaciğerinden MacConkey agar ve %5-7 koyun kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de 3-5 gün inkubasyona bırakıldı (Karaman ve Küçükayan, 2000; Muz ve ark.,1999).

Serolojik Muayeneler

Brucellosis: Brucellosis'in serolojik teşhisinde Rose Bengal Plate Test, serum aglutinasyon testi, komplement fizyasyon testleri uygulandı. Bunun için, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlanan lam aglutinasyon, tüp aglutinasyon ve komplement fizyasyon test antijenleri kullanıldı. Aglutinasyon testinde 1:20 dilasyonda (++)'lik, Komplement fizyasyon testinde 1:10 dilasyonda (++)'lik değer pozitif olarak değerlendirildi (Anon,1990).

Campylobacteriosis: Laboratuvar stok (*C.fetus subsp. fetus*) suşundan diyaliz yöntemi ile *Campylobacter* antijeni hazırlandı. Serumlar komplement fizyasyon test metoduyla işlendi. 1:4 dilasyonda (++)'lik sonuç pozitif olarak değerlendirildi (Ullman, 1981).

Salmonellosis: Pasteur Enstitüsünden sağlanan *Salmonella abortus ovis* suşundan hazırlanan antijen, tüp aglutinasyon testi için kullanıldı. Serum

1/200 dilasyonunda (++)'lik reaksiyon pozitif olarak kabul edildi (Aksoycan,1974; Arda ve ark.,1992).

Chlamydia: Serion firması tarafından getirilen *Chlamydia psittaci* antijeni komplement fizyasyon testlerinde kullanıldı. 1:32 dilasyonda (++)'lik sonuç pozitif olarak değerlendirildi (Treharne ve ark., 1983).

Bulgular

Mikrobiyolojik Muayene Sonuçları

463 adet koyun fetusunun mikrobiyolojik yönden incelenmesi sonucu 139'unda *Brucella spp.*, 6'sında *Campylobacter spp.* İzole edildi. İzole edilen *Campylobacter*lerin hepsinin de yapılan identifikasyonu sonucu *Campylobacter fetus subsp. fetus* olduğu tespit edildi. İzole edilen *Brucella* suşlarından gönderilen 61'inin Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma enstitüsünde yapılan biyotiplendirilmeleri sonucunda 57'sinde *Brucella melitensis* Biyotip 3, 3'ünde *Brucella melitensis* Biyotip 1 ve 1'inde *Brucella melitensis* Biyotip 3 Rev-1 suşu olarak saptanmıştır. Bu dönemde *Salmonella spp.* izole edilemedi. Elde edilen verilerin 2003–2007 yılları arasındaki dağılımları Tablo 2'de, 1993–1997 yılları arasındaki dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir. İstatistikî açıdan her iki çalışmadaki bütün yıllara ait toplam *Brucella spp.* ve *Campylobacter spp.* izolasyon sonuçları karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Ancak 2006 yılından itibaren *Brucella spp.* izolasyonundaki azalma istatistikî açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 1: 1993–1997 yılları arasında aborte fetustan izole edilen bakteri türleri dağılımı (Karaman ve Küçükayan, 2000)

Yıl	Fetus	<i>Brucella</i> spp.		<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.	
		+	%	+	%	+	%
1993	51	25	49,00	-	-	-	-
1994	65	13	20,00	-	-	-	-
1995	70	29	41,40	-	-	-	-
1996	63	24	38,10	4	6,35	2	3.17
1997	48	9	18,75	-	-	-	-
Toplam	297	100	33,70	4	1,30.	2	0.70

Tablo 2: 2003–2007 yılları arasında aborte fetuslardan izole edilen bakteri türlerinin dağılımı

Yıl	Fetus	<i>Brucella</i> spp.		<i>Campylobacter</i> spp.	
		+	%	+	%
2003	60	23	38,33	1	1,66
2004	113	42	37,16	1	0,88
2005	129	47	36,43	1	0,77
2006	89	13	14,61	-	-
2007	72	14	21,21	3	-
Toplam	463	139	30,02	6	1,29

Serolojik Muayene Sonuçları

2003-2007 yılları arasında enstitümüze gönderilen atık yapmış koyunlara ait 2635 kan serumu

Brucellosis, 1746 kan serumu *Campylobacteriosis*, 2376 kan serumu *Chlamydiosis* ve 1296 kan serumu ise *Salmonellosis* yönünden çeşitli serolojik testlerle incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4’de gösterilmiştir. Tablo 3’de de gösterildiği gibi 1993–1997 yıllarındaki serolojik muayene sonuçları karşılaştırıldığında bütün yılların toplam *Brucella* ve *Salmonella* sonuçları arasındaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmuş ancak bu sonuç test edilen serum sayılarındaki farklılık nedeniyle dikkate alınmamıştır ($p>0.05$). Bu farklılık incelendiğinde enstitümüze 1993–1997 yıllarına göre 2003-2007 yıllarında daha az abort yapmış koyun serumunun gönderildiği anlaşılmıştır.

Tablo 3: 1993–1997 yılları arasında abort yapmış koyunların kan serumlarından elde edilen Sonuçlar (Karaman ve Küçükayan , 2000)

Yıl	<i>Brucella</i>			<i>Campylobacter</i>			<i>Chlamydia</i>			<i>Salmonella</i>		
	Serum	Pozitif	%	Serum	Pozitif	%	Serum	Pozitif	%	Serum	Pozitif	%
1993	905	113	12,48	438	38	8,67	823	14	1,7	705	9	1,1
1994	1055	145	13,74	267	70	26,21	261	6	2,2	209	4	1,9
1995	2062	239	11,59	917	45	5,00	974	8	0,8	1070	18	1,7
1996	5488	853	15,54	1561	63	4,00	1255	26	2,0	2887	58	2,0
1997	2689	559	21,42	834	48	5,70	1577	34	2,1	2006	29	1,4
Toplam	12199	1909	15,60	4017	264	6,60	4890	88	1,8	6877	117	1,7

Tablo 4: 2003–2007 yılları arasında abort yapmış koyunların kan serumlarından elde edilen sonuçlar

Yıl	<i>Brucella</i>			<i>Campylobacter</i>			<i>Chlamydia</i>			<i>Salmonella</i>		
	Serum	Pozitif	%	Serum	Pozitif	%	Serum	Pozitif	%	Serum	Pozitif	%
2003	647	66	10,20	385	31	8,05	419	29	6,92	193	-	-
2004	336	115	34,22	517	51	9,86	764	13	1,70	307	-	-
2005	567	106	18,69	544	32	5,88	945	1	0,10	410	-	-
2006	154	64	41,55	199	12	6,03	150	-	-	119	3	0,88
2007	931	44	4,72	101	4	4,00	98	-	-	267	-	-
Toplam	2635	395	14,99	1746	130	7,44	2376	43	1,81	1296	3	0,23

Tartışma ve Sonuç

Ülke hayvancılığında önemli bir yere sahip olan koyun yetiştiriciliğinde yavru atımları önemli bir sorundur. Abortus, sadece bir yavru kaybı olmayıp süt veriminde azalmaya, damızlık değerinin düşmesine ve bazı durumlarda infertiliteye neden olması ile önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Atıklar üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Yılmaz,1987; Karaman ve Küçükayan, 2000; Kenar ve ark., 1990; Muz ve ark., 1999). Bu çalışmada 2003-2007 yılları arasında enstitümüze gönderilen 8053 adet atık yapmış koyuna ait serum serolojik olarak, 463 adet aborte fötüs ise bakteriyolojik olarak koyunlarda yavru atımına neden olan hastalıklar yönünden incelenmiştir.

Koyun atıklarının mikrobiyolojik yönden incelendiği çalışmalardan, Yılmaz (1987) 1982-1986 yılları arasında Ankara bölgesinde yaptıkları bir çalışmada koyun ve keçi fetus materyallerinin %18.52'sinde *Brucella spp.*, %4'ünde *Campylobacter spp.*, %1.6'sında *Salmonella spp.* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı bölgede yapılan bir başka çalışmada ise Karaman ve ark. (1993) 1989-1992 yılları arasında koyun fetuslarının %21.79'undan *B.melitensis*, %0.64'ünde *C.fetus* izole ve identifiye ettiklerini bildirmişlerdir.

Bölümümüzde yapılan ve 1993 ile 1997 yıllarını içine alan benzer bir çalışmada ise incelenen 297 aborte koyun fetusundan %33.70 *Brucella spp.*, %1.30 *Campylobacter spp.* ve %0.70 *Salmonella spp.* izole edilerek incelenen 12199 atık yapmış koyun kan serumunun 1909'u (%15.6) *Brucellosis* yönünden pozitif bulunurken, *Campylobacteriosis* yönünden incelenen 4017 kan serumunun 264'ü (%6.6), *Chlamydiosis* yönünden incelenen 4890 serumun 88'i (%1.8), *Salmonellosis* yönünden incelenen 6877 serumun 117'si (%1.7) pozitif olarak tespit edilmiştir (Karaman ve Küçükayan, 2000).

Koyunlarda atık etkenlerinin araştırıldığı bir çalışmada ise Muz ve ark. (1999), inceledikleri 110 atık fetustan 22 (%20)'sinde *Brucella spp.*, 5 (%4.5)'inde *Campylobacter spp.*, 4 (%3.6)'sında *Salmonella spp.* izole etmişlerdir. Aynı çalışmada 650 koyun ve keçi serum örneğinin 77 (%11.8)'sinde *Brucella*, 13 (%2)'sinde *Campylobacter* ve 13 (%2)'sinde *Salmonella*'ya karşı antikor varlığı serolojik testlerle ortaya konmuştur.

2003-2007 yıllarını kapsayan bu çalışmada *Brucella spp.* %30,02 ve *Campylobacter spp.* %1.29 oranında izole edilmiştir. İzole edilen *Campylobacter spp.*'lerin hepsi *C.Fetus subsp. fetus* olarak identifiye edilmiştir. Bu dönemde *Salmonella spp.* izole edilememiştir. Tespit edilen *Brucella* ve *Campylobacter*'in izolasyon oranları ile 1993-1997 yılları (Karaman ve Küçükayan, 2000) arasında bulunan sonuçlar arasında bir fark görülmemiştir.

Bu çalışmada Enstitümüze gönderilen Koyun kan serumlarının %14.99'undan *Brucellosis*'e, %7.44'ünden *Campylobacteriosis*'e, %0.23'ünden *Salmonellosis*'e ve %1.81'inden ise *Chlamydiosis*'e karşı antikor saptanmıştır. Alınan sonuçlar ile 1993-1997 yılları arasında yapılan çalışmadaki (Karaman ve Küçükayan, 2000) sonuçlar benzer bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada elde edilen veriler geçmiş çalışmaların devamı niteliğinde olup elde edilen bulguların diğer çalışmalar ile benzerlik taşıdığı ortaya konmuştur. Bu veriler ışığında *Brucella*'nın halen koyunlarda en önemli bakteriyel atık etkeni olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızda belirtilen 2006 yılındaki bakteriyel izolasyon sonuçlarındaki ve serolojik test sonuçlarındaki düşüşlerin, *Brucella*'nın halen önemli ve yaygın bir enfeksiyon olduğu gerçeğini değiştirmemiştir. Bunun nedeninin gönderilen numune sayısındaki farklılıklar olduğu anlaşılmış, ülkemizdeki koyun atık etkenlerinin son durumu hakkında bilgi edinmek için ülke çapında serolojik ve tarama testlerinin yapılmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Aksoycan, N. (1974): *Salmonella* enfeksiyonlarında widal deneyi nasıl yapılmalıdır. Mikrobiyol.Bull. 8: 411-417.
2. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). Techniques for the *Brucellosis* Laboratory. İNRA – Paris.
3. Anon (1990). *Brucella* Mücadele Talimatnamesi. III. Baskı Hay Araşt Ens Md.lüğü ofset tesisleri. Lalahan- Ankara, No:189.
4. Anon. (2000) *Campylobacter coli* and *J. jejuni*: in OIE Manual of Standard's for Diagnostic tests and vaccines. 3rd ed. Paris-France., 328-345
5. Anon (2007). *Ovine and Caprine Brucellosis: Brucella melitensis*. Erişim:http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_melitensis.pdf Son Erişim Tarihi: 29.11.2007
6. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö (1992). Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Basımevi – Erzurum.

7. **Cowan ST** (1981). Cowan and Steel's Manual for the identification of medical Bacteria 2nd ed. Cambridge Univ, Press- Cambridge.
8. **Devlet İstatistik Enstitüsü** (2004). Türkiye İstatistik Yıllığı. s: 163.
9. **Karaman Z, Güler E, Küçükayan U** (1993). Ankara bölgesinden toplanan ve değişik yörelerden gelen atık yapan koyun kan serumları ve materyallerinin serolojik ve mikrobiyolojik yoklaması üzerine çalışmalar. Etlik Vet Mikrobiol Derg 7: 60-73.
10. **Karaman Z, Küçükayan U** (2000). 1993-1997 yılları içinde enstitümüze gönderilen atık yapan koyun kan serumları ve materyallerinin serolojik ve mikrobiyolojik yoklama sonuçları. Etlik Vet Mikrob Derg 11:(1-2).
11. **Kenar B, Erganiş O, Kaya O, Güler L** (1990). Konya bölgesinde koyunlarda atıklara sebep olan Brucella, Campylobacter, Salmonella ve Chlamydia'ların bakteriyolojik ve serolojik incelenmesi. Veterinarium. 1: 17-19.
12. **Muz A, Ertaş HB, Öngör H, Gülcü HB, Özer H, Eröksüz H, Dabak M, Başbuğ O, Kalender H** (1999). Elazığ ve çevresinde koyun ve keçilerde abortus olgularının bakteriyolojik, serolojik ve patolojik olarak incelenmesi. Tr. J. Veterinary and Animal Sciences 23: 177-188.
13. **Nielsen K, Duncan JG** (1986). Animal Brucellosis. Boca Raton Ann Arbor Boston p: 383-409, Canada.
14. **Rosner B** (2006). Fundamentals of Biostatistics 6th edition. USA: Thomsan Brooks/Cole, p.: 385-379.
15. **Trehanne JD, Forsey J, Thomas BJ** (1983). Chlamydial serology. Br Med Bull 9:194-200.
16. **Ulmann, U** (1981): Seroepidemiological with Campylobacter fetus. Zhl. Bac. hyg.1. abst. orig.1, 250:554-556.
17. **Yılmaz S** (1987). Koyun ve keçilerde enfeksiyöz abortuslar. Koyun ve yetiştiriciliği hastalıkları sempozyumu 11-12 Mayıs – Konya.

Kıymada mikroskopik muayene ile yabancı doku tesbiti üzerine deneysel çalışma

Yıldız AYZ¹, Ertan ORUÇ², Yavuz ULUSOY¹, Yusuf Ziya KAPLAN¹, Mihriban AKSOY¹, Adnan ÖZTÜRK¹, Orhan DUDAKLI¹

¹ Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü; ² Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Özet: Çalışmada kas, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, tavuk derisi ve tavuk taşlığında hazırlanmış kıyma örneklerinden alınan kriyostat kesitleri incelenerek, söz konusu organ kıymalarının mikroskopik özellikleri araştırılmıştır. Hem sadece etten yapılan kıymada hem de iç organlardan hazırlanan kıymalarda, bu organların normal histolojilerine benzer yapılar gözlenmiştir. Sonuç olarak; kıymadan hazırlanmış kriyostat kesitlerin mikroskopik incelemesinin, karışık kıymaların tespitinde kullanılabilir bir yöntem olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: histoloji, kıyma, kriyostat, mikroskopi, sakatat

Experimental study on tissue detection by microscopical examination in minced meat

Summary: Microscopical features of those tissues were investigated by examining of cryostat sections prepared from meat, liver, lung, spleen, kidney, chicken skine and gizzard. Similar structures to normal histological appearance were observed in both minced meat and viscera. It is concluded that microscopical examination of cryostat sections prepared from minced meat and viscera would be applicable method in the diagnosis of different tissues in minced meat.

Key words: histology, cryostat, microscopy, minced meat, offal

Giriş

Son yıllarda hazır kıymaların sakatat, tavuk derisi ve tavuk iç organları ya da farklı et türleri gibi çeşitli ürünlerle karıştırılarak tüketime sunulduğu bildirilmekte ve bu konuda tüketicilerin dikkati çekilmektedir (Anonim,2008., Ayaz ve ark,2006; Erer ve ark,2000; Yücel, Ş,2005).

Çalışmada karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, kas, tavuk deri ve tavuk taşlığında hazırlanmış kıymalardan alınan kriyostat kesitleri incelenerek, iç organ katılmış olabileceği şüphe edilen kıyma örneklerinde yabancı doku tayini amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Ankara piyasasındaki et ve tavuk ürünleri satış noktalarından temin edilen her biri 500'er gram tavuk taşlığı, tavuk derisi, sığır eti ile sığır böbrek, akciğer, karaciğer ve dalak örnekleri deneysel materyal hazırlanmasında kullanılmak üzere soğuk zincir altında Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Gıda Kontrol Laboratuvarına ulaştırıldı. Tavuk taşlığı-tavuk derisi-sığır eti karışımı (karışım oranı=%33.33), Tavuk taşlığı ve sığır eti karışımı (%50 oranında), Tavuk derisi ve sığır eti karışımı (karışım oranı %50), kıyma maki-

nesinde çekilerek kıyma haline getirildi. Sığır böbrek, akciğer, karaciğer, dalak ve sığır eti örnekleri kuşbaşı büyüklüğünde doğranarak ayrı ayrı kıyma makinesinde çekildi. Kıyma makinesi her işlemde sonra hatalı karışımlara engel olmak amacıyla yıkanarak temizlendi.

Hazırlanan kıyma örnekleri homojenize edildi. Yaklaşık 5 gram ağırlığında homojen karışıma Cell-Freezer (Sigma, katalog no: C6295) eklenecek örnekler bulamaç haline getirildi. Bu karışımlara, yaklaşık 1x1x5 cm ebatında dikdörtgen prizma şekli verilerek, bir gece süreyle derin dondurucuda (-18 °C) bekletildi. Dondurulmuş örnekler çözünmeden 1cm³ lük parçalar halinde kesilerek histolojik kesitler almak için kriyostat cihazının (Reichert-Jung, 2800 fricult E) obje dondurma aparatına yerleştirildi ve yapışması için birkaç damla Cell-Freezer damlatıldı. Cihaz -30°C'ye ayarlandı. Dondurma işleminden sonra (3-4 saat), hazırlanan kıyma karışımları doku parçalarından önce trimleme işlemi yapılarak kesit yüzeyinin düzgün hale gelmesi sağlandı. Trimleme işleminden sonra örneklerden 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Her örnek için 10' adet preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar hematoksilin- eosin (H-E) (Günşen, U ve ark,

2006) ile boyanarak mikroskopik incelemeleri yapıldı ve uygun görülen preparatlardan mikroskopik fotoğraflar çekildi.

Bulgular

Karaciğer kıyma: Karaciğer kesitlerinde oldukça yoğun hücresel artış gözlenirken, karaciğerin normal lobüler yapısını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 1). Hepatositlerin sitoplazmik sınırları genelde kaybolmuşken, bazı bölgelerde sitoplazmik sınırlarını korumuş hepatositler dikkati çekti. Çekirdekler iri, veziküler yapıda olup çoğunlukla histolojik yapısını korumuştur. Portal bölge olduğu tahmin edilen alanlarda zaman zaman sağlam kalmış safra kanalları görülebilmektedir (Şekil 1). Söz konusu bölgede hücre yoğunluğunun diğer bölgelere oranla daha fazla olduğu dikkati çekti. (Şekil 1).

Akciğer kıyma: Akciğer kesitlerinde, akciğerin tipik mikroskopik alanlarından olan alveol yapıları kaybolmuştur. Ancak bronşiyoller yapıları hemen dikkati çekmektedir. İncelenen kesitlerde bronşiyol epitelinin kübik prizmatik yapısını muhafaza ettiği, hatta en dışta fibromusküler tabakasını da kaybetmediği dikkati çekmektedir (Şekil 2). Diğer alanların ise düzensiz bir şekilde çeşitli hücreler tarafından doldurulduğu gözlenmiştir.

Dalak kıyma: Dalak kesitlerinde düz kas ve bağ dokudan oluşan trabekül yapısı belirgin olup, diğer kısımların çekirdeklerden oldukça yoğun bir yapı gösterdiği gözlemlendi (Şekil 3). Kırmızı ve beyaz pulpaya ait yapılar belirgin olmayıp daha çok hücrelerin karışımı şeklindedir. Daha belirgin olan trabeküler parçaların ise ince uzun fibriler yapılar şekline ve mekik tarzda çekirdeklere sahip olduğu dikkati çekti.

Böbrek kıyma: Böbrek kıymalarından hazırlanan kesitlerde; normal böbrek yapılarında görülen glomeruler ve tubuler yapılar hemen dikkati çekmekteydi (Şekil 4). Glomeruler yapıların küçüldüğü ve çekirdeklerinin parçalanarak dağıldığı gözlemlendi. Tubuluslar ise, genelde lumenlerin daralarak kaybolmasıyla epitelyal bir hücre kümesini andırmakta idi. Hem tubulusların hem de glomerulusların sınırlarının genelde fark edildiği dikkati çekti.

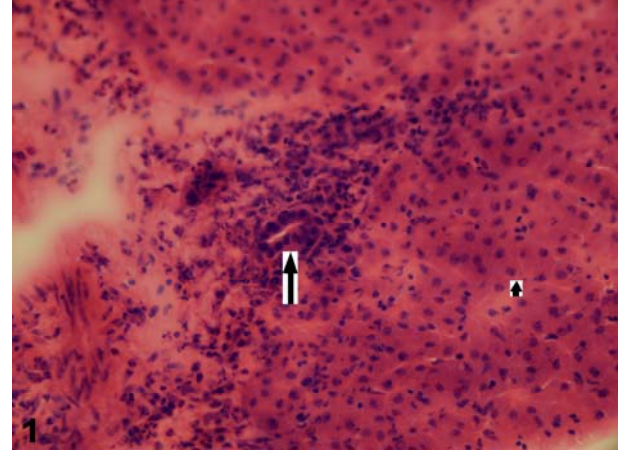
Kas doku kıyma: kırmızı et kıymalarından hazırlanan preparatlarda diğer organlara oranla daha homojen bir yapı ile karşılaşıldı (Şekil 5). Enine ya da uzunlamasına çıkmış kesitlerde; sitoplazmaların şişkin, homojen renkte boyanarak, mekik şekilli çe-

kirdeklerin ise periferde konumlandığı gözlemlendi. Zaman zaman görülen damar benzeri yapılarda eritrositlere hiç rastlanmadı.

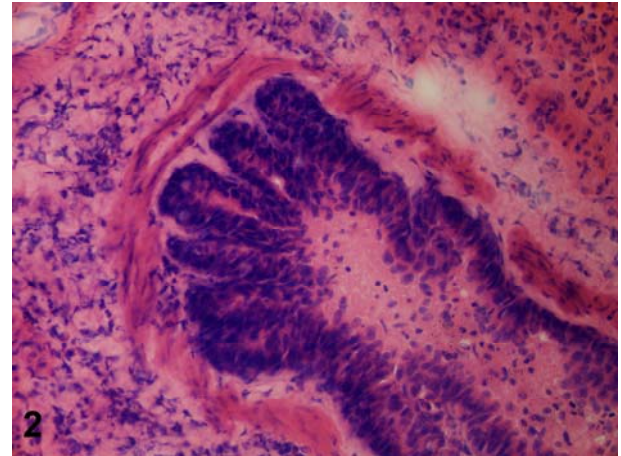
Tavuk taşlık kıyma: Tavuk taşlıktan hazırlanmış kesitlerin incelemesinde hücresiz ve şekilsiz keratinize yapılar mineralize alanlar benzeri bir yapı göstermekte idi (Şekil 6). Komşu bölgelerde ise, yine sitoplazmik sınırları belirgin olmayan, şekilsiz dokusal yapılar gözlemlendi.

Tavuk deri kıyma: Tavuk derisinin kriyostat kesitlerinde epidermise ait yapılar açık-koyu mor boyanmış bir bant şeklinde gözlenmiştir. Bu kısma komşu ve hemen altında ise geniş ve daha gevşek bir yapı gözlenirken, en altta bazal tabakayı andıran prizmatik hücre sırası kendini belli etmiştir (Şekil 7).

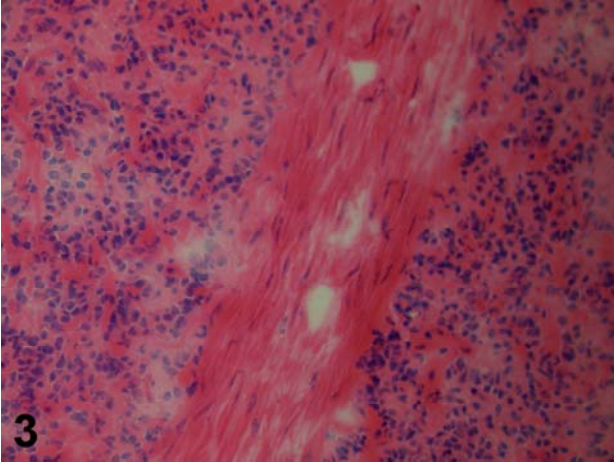
Tavuk derisi karıştırılmış kıyma: Bu preparatlarda deriye ait doku özellikleri ve epitelyal yapılar hemen kendini göstermektedir (Şekil 8). Preparata oldukça sınırlı yansımış kas yapıları, söz konusu epitelyal yapılar tarafından kapatılmıştı.



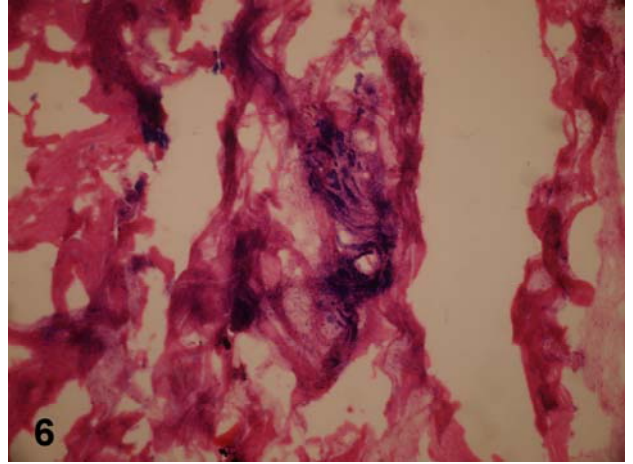
Şekil 1. Karaciğer kıyması. Sığır. Sitoplazmik sınırlarını korumuş hepatositler (kısa ok) ve safra kanalı (uzun ok). H-E.X400



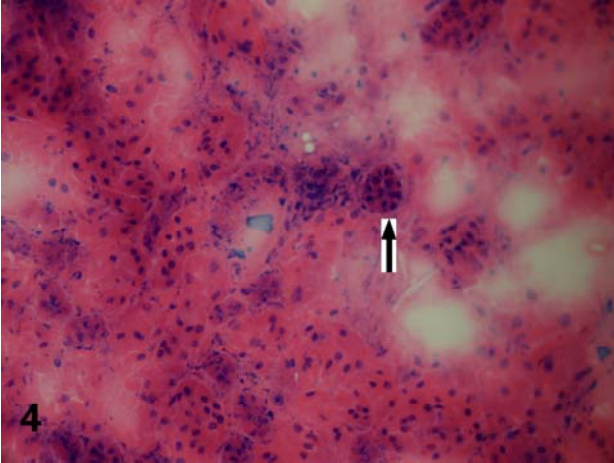
Şekil 2. Akciğer kıyması. Sığır. Sağlam bir bronşiyol. H-E.X400



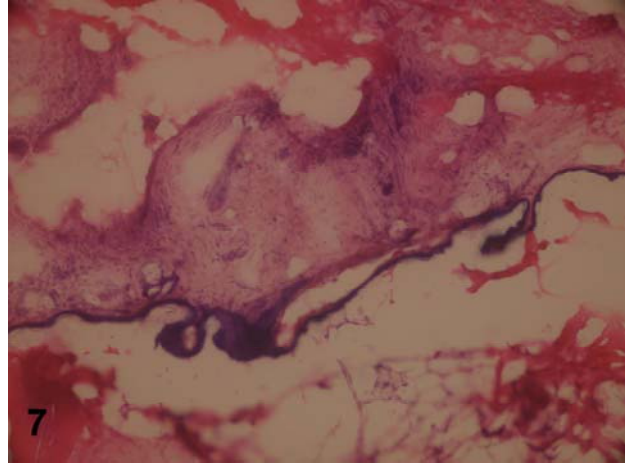
Şekil 3. Dalak kıyması. Sığır. Ortada bağ doku ağırlıklı trabeküler yapı. H-E.X400



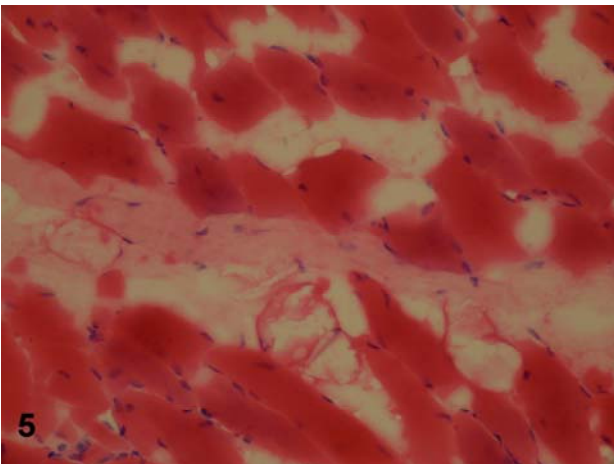
Şekil 6. Taşlık kıyması. Tavuk. Çekirdeklerini kaybetmiş kornifiye yapılar. H-E.X200



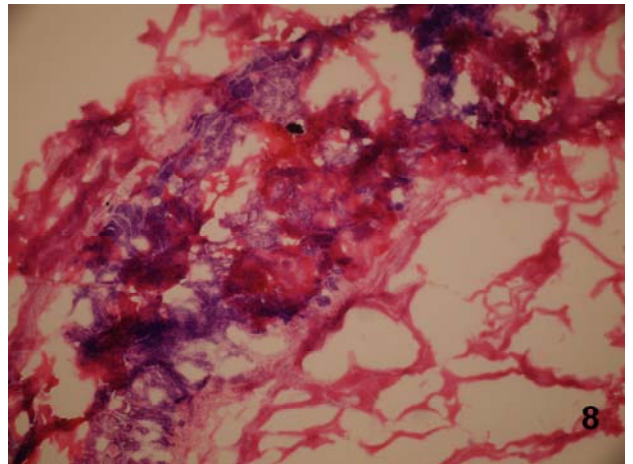
Şekil 4. Böbrek kıyması. Sığır. Selülaritesini kaybetmiş glomerüller ve bazal membranları belirgin, lumenleri daralmış tubuluslar (ok). H-E.X400



Şekil 7. Deri kıyması. Tavuk. Epidermal kitleler. H-E.X200



Şekil 5. Kas kıyması. Sığır. Çekirdekleri periferik yerleşimli tipik miyofibriller ve hyalini görünümleri. H-E. X400



Şekil 8. Tavuk derisi ve taşlık karıştırılmış kıyma. Epidermal yapılar arasında kaybolmuş kas dokuya ait parçalar. H-E.X200

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde gıda maddelerine hile karıştırılarak, tüketiciler düşük kaliteli gıda tüketimine maruz kalmaktadır. Böyle olunca gıda kontrolü her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Bu çalışmada çeşitli iç organlardan hazırlanan kıymalardan kriyostat ile hazırlanan preparatlarda, söz konusu organların literatürce bilinen doku özellikleri (Luna L.G. 1968; Sağlam M, 1993)'nin mikroskopik aranması ile kıymada yapılabilecek sakatat ve tavuk derisi katılması hilelerinin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

Kırmızı etten hazırlanmış kıyma preparatlarında, kas tellerinin uzunlamasına kesitlerinde tipik silindirik yapı gösterdiği ve çok sayıda mekik şekilli çekirdeklerin ise sitoplazmanın periferinde yerleşerek klasik kas dokusunu yansıttığı gözlenmiştir. Preparatlarda kan damarı benzeri oluşumlar dışında farklı özellikte, hücresel ya da dokusal yapıların bulunmamasının, bu preparatların tanınmasını kolaylaştıracağı düşünülmüştür. Normal kas tellerinin aksine ise, bu kesitlerde enine çizgilenmelerin kaybolduğu ve sitoplazmanın homojen bir boyanma gösterdiği gözlenmiş ve bu haliyle patolojik bir dejenerasyon şekli olan hyalin dejenerasyonu (Ayaz ve ark, 2006) benzeri bir görünüm aldığı dikkati çekmiştir.

Benzer şekilde karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, tavuk taşlık ve tavuk derilerinden hazırlanan kıymaların kriyostat kesitlerinde de söz konusu organlara ait histolojik yapı parçaları tespit edilmiştir.

Karaciğer kıyma kesitlerinde safra kanal yapılarının, akciğer kıyma kesitlerinde bronşiyoller yapıların, dalakta trabeküler parçaların, böbrekte glomeruler ve tubuler yapılar ile tavuk deri ve taşlığında ise keratinize ve epitelyal yapıların görülmesi bu organlara ait parçaların tanınması bakımından önemli ipuçları olarak değerlendirilmiştir.

Kaynaklar

1. **Anonim** (2008) Gıdada hileye sınır yok. <http://www.radikal.com.tr/haber.php?haberno=173870>. Erişim Tarihi: 10.02.2008.
2. **Ayaz, Y., Ayaz, N.D., Erol, I.** (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Muscle Foods*. 17: 214–220.
3. **Erer, H., Kıran MM, Çiftçi .MK,**(2000) Veteriner genel patoloji. 1. Baskı. Bahçivanlar Basım sanayi A.Ş.
4. **Günşen U, Aydın A, Ovalı BO Coşkun Y,** (2006) Çiğ et ve ısıtılmış işlem görmüş et ürünlerinde elsa tekniği ile farklı et türlerinin tespiti. 36(2). Online Erişim: <http://www.istanbul.edu.tr/fakulteler/veteriner/vetfakdergi/yayinlar/2006-2/Makale-5.pdf>.
5. **Luna LG,** (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd Ed., Mc Graw-Hill Book Company, New York, USA..
6. **Sağlam M,** (1993) Genel Histoloji. Yorum Matbaacılık Sanayi. Ankara.
7. **Tanyolaç A,** (1993) Özel Histoloji. Yorum Basım Yayın Sanayi Ltd. Şti. Ankara.
8. **Yücel Ş,** (2005) Hileli gıdayı afiyetle yiyin. <http://www.takvim.com.tr/2005/08/10/gnb105.html> Erişim tarihi: 08.02.2008

Metil Parathion'un sıçanların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve E'nin koruyucu rolü

Ayşe ÖĞÜTCÜ¹, Yavuz ULUSOY², Kevser KAHRAMAN¹, Meltem UZUNHİSARCIKLİ¹, Fatma Gökçe UZUN¹, Hakkı TAŞTAN³

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; ² Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Patoloji Bölümü; ³ Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Özet: Organofosfatlı bir insektisit olan metil parathion zirai mücadelede sıklıkla kullanılmakta ve zehirlenmelere neden olmaktadır. Bu çalışmada, metil parathion (0.28 mg/kg gün), vitamin C (200 mg/kg gün)+vitamin E (200 mg/kg gün), vitamin C (200 mg/kg gün)+vitamin E (200 mg/kg gün)+metil parathion (0.28 mg/kg gün) erkek sıçanlara oral gavaj yoluyla verildi. Muameleden 4 hafta ve 7 hafta sonra sıçanların ince bağırsaklarındaki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobuyla incelendi. Metil parathion muamelesinden 4 ve 7 hafta sonra ince bağırsaklardaki villuslarda genişleme tespit edildi. Buna ilaveten 7. hafta sonunda bazı bölgelerde infiltrasyon gözlemlendi. Vitamin C+vitamin E+metil parathion muamelemeli grupta da 4 ve 7 hafta sonra sıçanların ince bağırsaklarında villusların yapısının bozulduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak düşük doz metil parathion sıçanların ince bağırsaklarında histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır. Vitamin C ve vitamin E'nin, metil parathionun ince bağırsaklarda meydana getirdiği patolojik değişiklikleri önleyemediği tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Metil parathion, pestisit, histopatoloji, vitamin C, vitamin E, ince bağırsak

Effect of Methyl Parathion on the Rat Small Intestine Tissue and Protective Role of Vitamin C and E

Summary: Methyl parathion, an organophosphorous insecticide, is widely used in agricultural control and causes poisoning. In the present study, methyl parathion (0.28 mg/kg day), vitamin C (200mg/kg day)+vitamin E(200 mg/kg day), vitamin C (200mg/kg day)+vitamin E (200 mg/kg day)+methyl parathion (0.28 mg/kg day) were given to male rats through gavage. Histopathological changes were investigated using light microscope 4 and 7 weeks after administration. After 4 and 7 weeks of methyl parathion exposure, dilatation was observed in intestinal villi. Addition to this, infiltration in some area was observed 7 weeks after. After 4 and 7 weeks of vitamins C+vitamin E+methyl parathion exposure, degenerative changes were detected in the intestinal villi.

As a result, lower doses of methyl parathion caused histopathological changes in the rat small intestine. It's determined that vitamin C and vitamin E haven't prevented the pathological changes caused by methyl parathion in small intestine.

Key Words: Methyl parathion, pesticides, histopathology, vitamin C, vitamin E, small intestine

Giriş

Pestisitler, ziraatta istenmeyen böceklerin yok edilmesini sağlayarak besin üretimini yükseltmek ve hastalık yapıcı vektörleri kontrol etmek için yıllardır kullanılmaktadır (Prakasam ve ark., 2001). Yaygın pestisitler arasında olan organofosforlu bileşikler ziraatta, tıpta ve endüstride kullanılmaktadır (Storm ve ark., 2000). Organofosfatlı pestisitler hedef dokularda asetilkolinesteraz ve pseudokolinesterazı inhibe etmektedirler (John ve ark., 2001; Kalender ve ark., 2006). Organofosforlu bileşikler pankreas (Yurumez ve ark., 2007), karaciğer (Kalender ve ark., 2005), kalp (Ogutcu ve ark., 2006) gibi organlarda toksisiteye sebep olabilmektedir.

Metil parathion (C₈H₁₀NO₅PS), (O, O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate) asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini inhibe eden

organofosforlu bir pestisittir. Metil parathion tarım ve bahçecilikte pamuk, mısır, lahana, patates, buğday, soya fasülyesi gibi ürünlerdeki istenmeyen böceklerin kontrolünde dünyada yaygın ve etkili olarak kullanılmaktadır. Metil parathiona maruziyet sonucu erkek üreme sisteminde (Uzunhisarcıklı ve ark., 2007) ve böbreklerde (Kalender ve ark., 2007) olumsuz etkiler ortaya çıkmıştır.

Pestisit toksisitesini içeren deneysel çalışmalarda vitamin C ve vitamin E kullanılmaktadır (Kalender ve ark., 2007; Uzunhisarcıklı ve ark., 2007). İnsektisitlerin çoğu hidrofobik moleküllerdir ve biyolojik membranların özellikle fosfolipid tabakalarına bağlanırlar (Lee ve ark., 1991). Vitamin E lipofilik özelliktedir, çok güçlü bir antioksidan olan vitamin E hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden

koruyucu savunma elemanıdır. Vitamin E süperoksit, hidroksil, singlet oksijen ve lipid peroksil radikallerini temizler. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder (John ve ark., 2001). Vitamin C hidrofilik özelliktedir ve ekstrasellüler sıvıdaki serbest radikalleri ve sıvı fazdaki radikalleri temizler ve biyomembranları peroksidatif hasardan korumak üzere hareket eder (Yavuz ve ark., 2004; Sulak ve ark., 2005). Süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Aynı zamanda vitamin C membrandaki tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini sağlar (Lunec ve Blake 1990).

Bu çalışmanın amacı metil parathion muamelesinden 4 ve 7 hafta sonra sıçanların ince bağırsak dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikleri incelemek ve aynı zamanda metil parathionun ince bağırsak dokusunda sebep olduğu patolojik değişiklikler üzerine vitamin C ve vitamin E'nin koruyucu etkisini araştırmaktır.

Matertal ve Metot

Hayvanlar: Deneyde 320-340 g ağırlığında erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edilen sıçanlar özel besleme kafesleri içinde, her kafeste 6 sıçan olacak şekilde yerleştirildi. Sıçanlar standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi. Sıçanlara 18-22°C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı. Sıçanlar uygulama yapılmadan 10 gün önce karantina altına alındı.

Kimyasallar: %99 saflıkta metil parathion, Ankara Zirai Mücadele Merkezi'nden sağlandı. Vitamin E (DL- α -tokoferol) (Merck) ve vitamin C (L-askorbik asit) (Carlo Erba), Dizdarer firmasından sağlandı.

Hayvanlara uygulama planı: Sıçanlar kontrol grubu (n=12) ve uygulama grubu (n=36) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Uygulama grubu da kendi içinde üç gruba ayrıldı, metil parathion uygulanan grup (n=12), vitamin C+vitamin E uygulanan grup (vitaminli grup) (n=12), metil parathion+vitamin C+vitamin E uygulanan grup (n=12). Her gruptan 6 sıçan uygulamadan 4 ve 7 hafta sonra disekte edildi ve ince bağırsak dokuları ışık mikroskobu incelemeleri için alındı.

Kontrol grubu: Her bir sıçana günlük 1 ml/kg dozda mısır yağı oral olarak gavaj yolu ile verildi.

Vitamin C+vitamin E muameleli grup: Her bir sıçana günlük 200 mg/kg vitamin C (L-askorbik asit)

oral gavaj yolu ile verildi. Daha sonra aynı sıçanlara 200 mg/kg vitamin E (DL- α -tokoferol) oral gavaj yolu ile verildi. Vitamin C su içinde (1ml/kg)ve vitamin E mısır yağı (1ml/kg) içinde çözüldü.

Metil parathion muameleli grup: Her bir sıçana günlük 0.28 mg/kg (1/50 LD50) dozunda metil parathion mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yolu ile uygulandı.

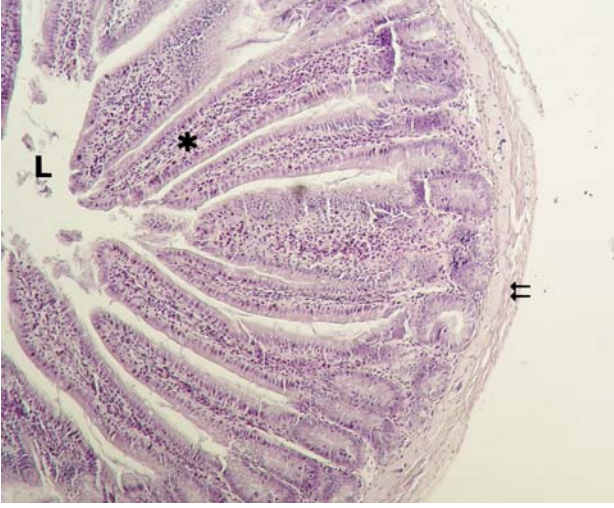
Metil parathion+vitamin C+vitamin E muameleli grup: Her bir sıçana günlük 200 mg/kg dozda vitamin E (DL- α -tokoferol) mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yoluyla verildi. Yine aynı sıçanlara 200 mg/kg dozda vitamin C (L-askorbik asit) distile su içinde çözülerek yine oral gavaj yoluyla verildi. Aynı sıçanlara günlük 0.28 mg/kg (1/50 LD50) dozunda metil parathion mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yoluyla uygulandı. Sıçanlara metil parathion uygulaması vitaminler uygulandıktan 30 dakika sonra yapıldı.

Işık mikroskobu incelemeleri: Histopatolojik incelemeler için, ince bağırsak dokuları disekte edildi ve doku örnekleri Bouin solusyonu içinde 14-18 saat tespit edildi, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre olan dokular parafin ortamında bloklandı. Parafin bloklardan 6-7 μ m kalınlığında ince kesitler alındı ve alınan kesitler ışık mikroskobu incelemeleri için hematoksilin eozin ile boyandı. Kesitler fotoğraf makinesi (Olympus C-5050, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

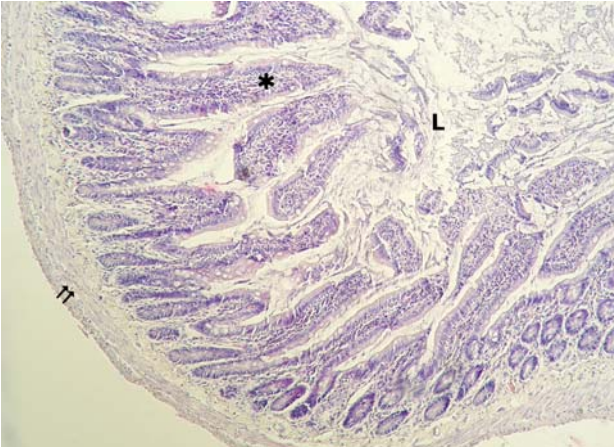
Bulgular

Kontrol grubu ve vitamin C+vitamin E muameleli sıçanların ince bağırsaklarına ait histolojik kesitlerde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. İnce bağırsağı astarlayan villuslar ve bu yapıların üzerinde bulunan epitel hücreleri normal yapıda görülmektedir (Resim 1, Resim 2). Metil parathion verildikten 4 hafta sonra sıçanların ince bağırsaklarındaki villuslarda genişleme tespit edildi (Resim 3). Vitamin C+vitamin E+metil parathion muamelesinden 4 hafta sonra sıçanların ince bağırsaklarındaki bazı villuslarda dejenerasyon ve granülasyon gözlemlendi (Resim 4). Metil parathion verildikten 7 hafta sonra sıçanların ince bağırsaklarındaki villuslarda genişlemenin yanı sıra aşırı derecede granülasyon tespit edildi (Resim 5). Buna ilaveten bazı bölgelerde hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 5). Vitamin

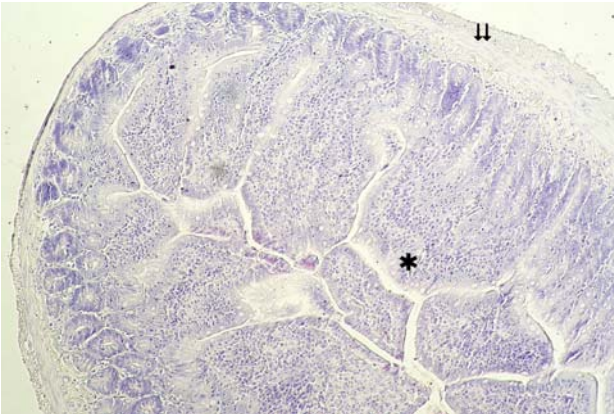
C+vitamin E+metil parathion muamelesinden 7 hafta sonra sıçanların ince bağırsaklarında villus yapısının bozulduğu gözlemlendi (Resim 6).



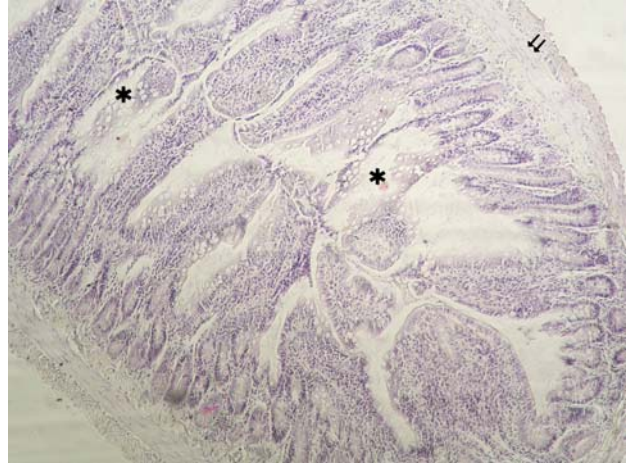
Şekil 1: Kontrol grubu ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. L: Lümen, ó: Villus, I: Kas, X200



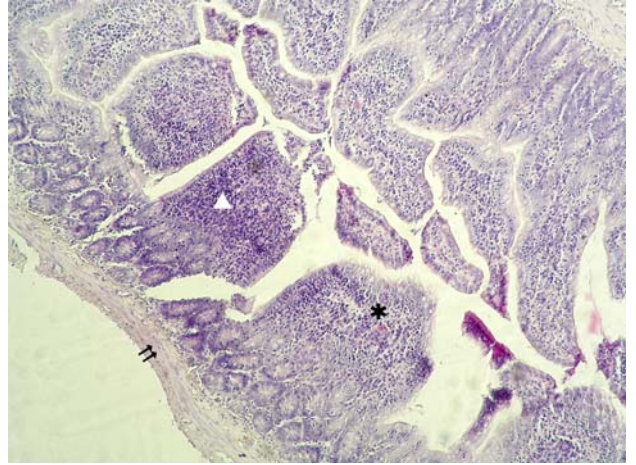
Şekil 2: Vitamin C+vitamin E uygulanmış ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. L: Lümen, ó: Villus, I: Kas, X200



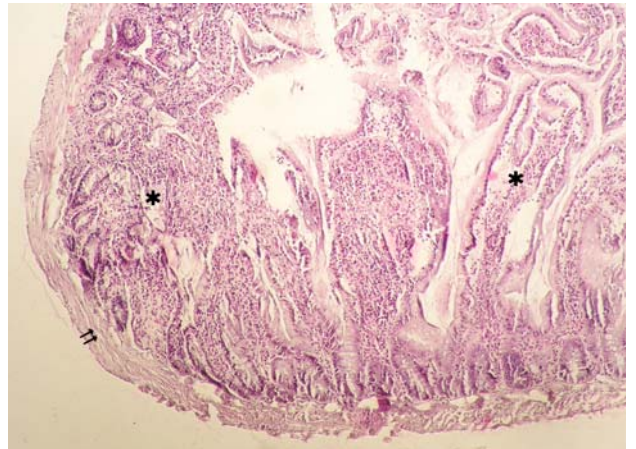
Şekil 3: Metil parathion muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda genişleme (ó) . I: Kas, X200



Şekil 4: Vitamin C+vitamin E+metil parathion muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda dejenerasyon (ó).I: Kas, X200



Şekil 5: Metil parathion muamelesinden 7 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda genişleme (ó) ve granülasyon (▲), I: Kas, X200



Şekil 6: Vitamin C+vitamin E+metil parathion muamelesinden 7 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda dejenerasyon (ó).I: Kas, X200

Tartışma ve Sonuç

Akut ve kronik çalışmalar metil parathionun memelilere çok toksik olduğunu göstermiştir. Memeliler metil parathion oral, dermal ve inhalasyon yoluyla maruz kalmaktadır (Garcia ve ark., 2003). Metil parathion yalnız memelilere değil aynı zamanda balıklara, kuşlara ve hedef olmayan diğer omurgasızlara da toksik etki göstermektedir (Solecki ve ark., 1996; Fanta ve ark., 2003). Metil parathionun oral LD₅₀ dozu erkek ratlarda 14 mg/kg, dişi ratlarda ise 24 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Gains, 1960). 0.218 mg/kg ve 0.872 mg/kg metil parathion ratlara oral yolla uygulandıktan sonra ratlarda nörotoksik ve immünotoksik değişiklikler olduğunu ifade edilmiştir (Institoris ve ark., 2004). Bu çalışmada da metil parathion 1/50 LD₅₀ oranında erkek ratlara verildi ve muameleden 4 ve 7 hafta sonra ince bağırsakta patolojik değişiklikler gözlemedi. Fakat deney süreci boyunca ölüm gözlenmedi.

Bu çalışmada metil parathionun subakut (4 hafta) ve subkronik (7 hafta) etkisi araştırıldı. Metil parathionun akut toksisitesi asetilkolinesterazın inhibisyonu sonucu ortaya çıkar. Bu çalışmada asetilkolin esteraz ölçümü yapılmadı. Ancak metil parathionun da diğer organofosfatlı insektisitler gibi asetilkolin esterazı inhibe ettiği bilinmektedir (Abou-Donia, 1994; Abu-Qare ve Abou-Donia 2001).

Pestisitler memelilerde ve diğer canlı dokularında histopatolojik ve sitopatolojik değişikliklere neden olmaktadır (Kalender ve ark., 2005; Sulak ve ark., 2005; Tos-Luty ve ark., 2001; Tos-Luty ve ark., 2003). Metil parathion uygulandığı sıçanların testis dokularında nekroz ve ödeme sebep olurken, böbreklerinde de nekroz, ödem, glomerular atrofi ve infiltrasyona yol açmıştır (Uzunhisarcıklı ve ark., 2007; Kalender ve ark., 2007). Bu çalışmada metil parathion muamelesinden 4 ve 7 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında patolojik değişiklikler gözlemedi. Ayrıca metil parathion muamelesinden 7 hafta sonra hücre infiltrasyonu tespit edildi. Mononükleer hücre infiltrasyonu ince bağırsakta ödem ve inflamasyon olduğunun bir göstergesidir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda vitamin C ve vitamin E'nin toksik maddelerin sebep olduğu hasarı önlediği ya da azalttığı gösterilmiştir (Kalender ve ark., 2004; Kalender ve ark., 2005; Kalender ve ark., 2007; Yavuz ve ark., 2004). Vitamin E biyolojik zarlarda bulunan potansiyel bir antioksidan

maddedir. Vitamin C indirgeyici aktivitesiyle güçlü bir antioksidandır. Her iki vitamin de hücrelerde meydana gelen ve hasara neden olan serbest radikalleri yok eden antioksidanlardır. Bu çalışmada vitamin C+vitamin E+metil parathion uygulanmış ratların ince bağırsaklarında da histopatolojik değişiklikler gözlemedi.

Sonuç olarak metil parathion ince bağırsakta ciddi patolojik değişikliklere sebep oldu. Vitamin C ve vitamin E, metil parathionla beraber verildiklerinde de ince bağırsaklarda patolojik değişiklikler izlenmiştir. Sonuç olarak vitamin C ve vitamin E'nin, ince bağırsakta metil parathionun sebep olduğu hasarı koruyamadığını söylemek mümkündür.

Kaynaklar

1. **Abou-Donia MB**, (1994). Organophosphorous pesticides. In: Chang, L.W., Dyer, R.S., (Eds.), Handbook of neurotoxicity. Marcel Dekker, New York. 419-473.
2. **Abu-Qare AW, Abou-Donia MB**, (2001). Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzyme activity following a single cutaneous dose of methyl parathion and diazinon, alone and in combination, in pregnant rats. *J Appl Toxicol*. 21, 307-316.
3. **Fanta E, Rios FSA, Romao S, Vianna ACC, Freiberger S**, (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotox Environ Safe*. 54, 119-130.
4. **Gains TB**, (1960). The acute toxicity of pesticides to rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2, 88-99.
5. **Garcia SJ, Abu-Qare AW, Meeker-O'connell WA, Borton AJ, Abou-Donia MB**, (2003). Methyl Parathion: A review of health effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 6, 185-210.
6. **Institoris L, Papp A, Siroki O, Banerjee BD**, (2004). Comparative investigation of behavioral, neurotoxicological, and immunotoxicological indices in detection of subacute combined exposure with methyl parathion and propoxur in rats. *Ecotox Environ Safe*. 57, 270-277.
7. **John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D**, (2001). Protective effect of vitamin E dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*. 12, 500-504.
8. **Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F**, (2004). Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: The protective effect of vitamin E. *Toxicology*. 3, 227-235.
9. **Kalender S, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Açıkgöz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y**, (2005). Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E

- on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology* 211, 197-206.
10. **Kalender Y, Uzunhisarcıklı M, Ögütçü A, Acıkgöz F, Kalender S,** (2006). Effects of diazinon pseudocholinesterase activity and haematological indicators in rats: The protective role of vitamin E. *Environ Toxicol Phar.* 22, 46–51.
 11. **Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Cevrimli BS, Yıldırım M,** (2007). Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic Biochem Physiol.* 88, 213–218.
 12. **Lee A, East J, Balgaug P,** (1991). Interactions of insecticides with biological membranes. *Pestic Sci.* 32,317-327.
 13. **Lunec J, Blake D,** (1990). Oxygen Free Radicals: Their relevance to disease processes, In: Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. *The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease*, Bailliere Tindall, London. p.189-212.
 14. **Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F, Kalender Y,** (2006). The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. *Pestic Biochem Physiol.* 86(2), 93-98.
 15. **Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S,** (2001). Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta.* 103, 107–112.
 16. **Solecki R, Fagi AS, Pfeil R, Hilbig V,** (1996). Effects of methyl parathion on reproduction in the Japanese quail. *Bull Environ Contam Toxicol.* 57, 902-908.
 17. **Storm E, Karl KR, Doull J,** (2000). Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red cell acetylcholinesterase. *Toxicology.* 150,1–29.
 18. **Sulak O, Altuntaş I, Karahan N, Yıldırım B, Akturk O, Yılmaz Hr, Delibaş N,** (2005). Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamin E and C. *Pestic Biochem Physiol.* 83, 21-287.
 19. **Tos-Luty S, Haratym-Maj, Latuszynska J, Obuchowska-Przebirowska D, Tokarska-Rodak M,** (2001) Oral toxicity of deltamethrin and fenvalerate in swiss mice. *Ann Agric Environ Med.* 8, 245-254.
 20. **Tos-Luty S, Obuchowska-Przebirowska D, Latuszynska J, Tokarska-Rodak M, Haratym-Maj A,** (2003). Dermal and oral toxicity of malathion in rats. *Ann Agric Environ Med.* 10, 101-106.
 21. **Uzunhisarcıklı M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ögütçü A, Büyükkömürçü F,** (2007). Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic Biochem and Physiol.* 87, 115–122.
 22. **Yavuz T, Delibaş N, Yıldırım B, Altuntas I, Candır O, Cora A, Karahan N, İbrişim E, Kutsal A,** (2004). Vascular wall damage in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Arch Toxicol.* 78, 655-659.
 23. **Yürümez Y, Yavuz Y, Sahin O, Ciftçi İH, Özkan S, Büyükkuroğlu ME,** (2007). Can diphenhydramine prevent organophosphate-induced acute pancreatitis? An experimental study in rats. *Pestic Biochem Physiol.* 87, 271–275.

Antifriz Proteinler

Gizem Işıl BEKTAŞ¹, Arif ALTINTAŞ²

¹ T.K.B. Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Etlik, Ankara-Türkiye; ² Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD, 06110-Ankara-Türkiye

Özet: İlk kez Antartik sularında yaşayan Notothenioidei'lerde varlığı gösterilen Antifriz proteinler (AFGP ve AFP) her biri üç amino asitlik bir peptid zincirinin üçüncü amino asidine kovalan bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin (alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetilgalaktozamin)n tekrarlanması ile meydana gelen bir glikopeptid yapıdadır. Bu glikopeptidler balığın derisinden vücuda giren ufak buz kristallerine hidroksil grupları (-OH), diğer polar grupları ve amino asit zincirlerindeki karbonil (=C=O) grupları ile tutunup, kristallerin büyümesini önleyerek canlıyı donmaya karşı korumaktadır. Antifriz proteinlerin tripsinojen genin birtakım çoğalmaları sonucunda oluştuğu ve karaciğer ve deri kaynaklı olabileceği, antifriz protein ailesinin bitki ve böcek tipine ek olarak 5 tip proteini kapsadığı saptanmıştır. Günümüzde bu proteinler tıp, gıda ve endüstri alanlarında etkin biçimde kullanılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Antifriz protein, Balık antifriz proteinleri, Buz şekillendirici proteinler.

Antifreeze Proteins

Summary: Antifreeze proteins first found in the Notothenioidei in Antarctic ocean. The protein consist of a repeated glycopeptide, Ala-Ala-Thr-galactosyl-N-acetyl galactosamine. These glycopeptides made bond with hydroxyl (-OH) and carbonyl (=C=O) groups to the ice crystal to prevent freezing. While ice crystal was entering the skin antifreeze proteins bind to ice crystal, by this way crystal growth can be stopped. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene and origin from skin or liver. Antifreeze proteins family has 5 type of protein, plant and insect form. Nowadays antifreeze proteins are common used in foods, medical and industrial area.

Key words: Antifreeze Protein, Fish Antifreeze Proteins, Ice Structuring Proteins.

Giriş

Dünya üzerindeki pek çok organizma topluluğu, değişen ekolojik koşullara başarıyla adapte olmalarını sağlayan değişimler göstermiştir. Bu değişimler, yaşanan ortamın fiziksel ve kimyasal koşullarına bağlı olduğu gibi göç, üreme davranışları ve beslenme alışkanlıkları gibi farklı biyolojik faktörlerin etkisinde kalır. Kazanılan bu adaptasyonlardan güncel gelişime en iyi örnek buzullarda yaşayan balıklardır. Antartik Okyanusu soğuyup buzullarla kaplandığında balık türlerinin çoğu yok olmuştur. Buna karşın, bir alt takıma (Notothenioidei) ait balıklar güçlüklerin üstesinden gelebilmişlerdir. Buzullarda yaşamaya adapte olmuş bu balıkların soğuk okyanuslarda başarıyla yaşamlarını sürdürebilmelerinin sebebi glikoprotein yapıda antifriz moleküller (AFGP) salgılamalarıdır.

Antartika sularındaki buz, balıklar için ciddi tehlikedir. Çünkü balığın solungaçlarından ve derisinden kolayca sızabilmektedir. Soğukkanlı hayvanlar olan ve temelde çevreleriyle aynı ısıya sahip

olan balıklar, kanları dengedeki donma noktasının 1°C altına kadar soğuduğunda bile yaşamlarını sürdürebilirler; bu buz kristallerinin oluştuğu ısıdır. Ancak balıkların aşırı soğumaya dayanabilmeleri ve vücut sıvılarının akıcılığını korumaları bedenlerine buz girmedeği sürece mümkün olmaktadır. Isısı dengedeki donma noktasının 0,1°C altına düşmüş balığın çevresindeki buz, balığın derisinden içeri hızla sızarak vücut sıvılarını dondurur. Çoğu tropik ve ılıman iklim balıkları, çevrelerindeki suda buz olduğu takdirde vücut ısısı -0,8°C civarına düşüğünde donarlar. Fakat Antartika Notothenioideilerinin donması için ısının -2,2°C'ye düşmesi gerekir (Eastman ve DeVries, 1986).

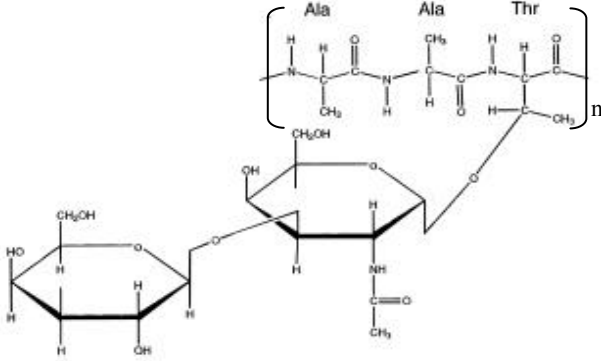
Antartik balıkların düşen donma noktasını dengelemeleri ve hayatta kalabilmeleri, vücut sıvılarında bulunan sekiz antifriz molekülü ile mümkün olmuştur. Bu moleküller takımı idrar ve göz sıvıları dışındaki vücut sıvılarında ve hücre stoplazmasında bulunur (Eastman ve DeVries, 1986).

Antifriz glikoprotein (AFGP) ilk kez Antartika'da yaşayan bir balık türü olan *Notothenioid*'lerde bulunmuştur (Crevel ve ark, 2002). Antifriz moleküllerinin varlığı daha sonra *Nototheniidae*, *Artedidraconidae*, *Batydracanyidae*, *Channichthyidae*, *Muraenolepididae*, *Liparididae*, *Zoarcidae* ve *Myctophyidae* ailelerine ait toplam 37 türde tespit edilmiştir (Sidell, 2000).

Antifriz proteinler günümüzde tıp, gıda ve endüstri alanlarında kullanılmaya başlanmış ve önemli bir hale gelmiştir. Bu nedenle derlemede, antifriz proteinlerin bazı özellikleri ile ilgili bilgi verilmesi ve tanıtılması amaçlanmıştır.

Antifriz proteinlerin yapısı ve görevleri

Antifriz molekülleri glikopeptid yapıdadır (alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetil galaktozamin)n. Her biri üç amino asitlik bir peptid zincirinin üçüncü amino asidine kovalan bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin tekrarlanmasıyla meydana gelir (Crevel ve ark., 2002) (Şekil 1).



Şekil 1. Antifriz proteinlerde ortak monomer yapı

Glikopeptidler olarak bilinen bu antifriz molekülleri kendini tekrarlayan alt birimlerden oluşur ve molekül ağırlıklarına göre numaralandırılır: En ağır 33 700 daltonluk molekül olup No.1; en hafifi ise 2 600 daltonluk molekül olup No 8 olarak numaralanır. Bir'den beş'e kadar olan glikopeptidlerde tekrarlanan amino asit dizisi alanin-alanin-threonin'dir. Altı-sekiz no'lu glikopeptidlerde ise alaninlerin bazıları prolin ile yer değiştirmiştir (Crevel ve ark, 2002).

Bileşiklerin molekül ağırlıkları arttıkça, antifriz etkileri de artar ve görünürde sekiz molekül de işlevlerini benzer şekilde yürütür (Sidell, 2000).

Notothenioid antifrizlerinin sıvının donma noktasını nasıl düşürdüğünü anlayabilmek için, bunların

etkinlik biçimlerini vücut sıvılarında çözünmüş glikoz ve sodyum klorür gibi daha tipik maddelerin etkinlikleriyle karşılaştırmak gerekir. Çoğu çözeltilerin donma noktası, bu çözeltinin bağlaşık özelliklerine, yani içindeki çözünmüş parçacıkların sayısına bağlıdır. Ne kadar çok parçacık varsa, su moleküllerinin kümeleşerek buz kristali oluşturma olasılığı o denli azdır. Sodyum klorür, su içerisinde sodyum ve klorür iyonlarına ayrıştığı için, sodyum klorürün suyun donma noktasını düşürücü etkisi, tek başına parçacık etkisinin yaratabileceğinden 200-300 kat daha fazladır (DeVries ve ark, 1970).

Glikopeptid antifrizlerin ufacık buz kristallerine tutunup, onların büyümelerini engellemek suretiyle Antartik balıklarının donmaya karşı koruduğu gösterilmiştir. Buzun yüzeyine tutunmuş glikopeptidler kristal büyümesini engeller. Bir buz kristali çevresindeki sıvının içindeki su moleküllerinin kristalin yatay düzlemine basamaklar halinde eklenmesiyle büyümektedir. Fakat, glikopeptid antifrizleriyle karşılaşan basamaklar eğilmektedir (Şekil 2). Bu durum, çevredeki sıvının sıcaklığı düşmediği sürece kristallerin büyümesini durdurur (Eastman ve DeVries, 1986).

Notothenioid'ler buz içermeyen su içine konulduklarında, ısıları -6°C 'ye düşene kadar donmamaktadır. Vücut içine dışarıdan buz sızmadığı sürece içeride buz kristalleri oluşmamaktadır. *Notothenioid*'lerin soğuğa karşı dayanabilme yeteneklerine yönelik asıl tehlike dışarıdaki buzdur ve antifriz proteinlerin asıl rolü de buzun deriden içeri sızmasını önlemektir. Pulları alınmış derinin iç yüzeyi antifriz molekülleri içeren tuz çözeltisine batırıldığında, deri dışardan buz girmesini önleyen bir engel olarak iş görmektedir; suya antifriz molekülleri eklenmemişse buz kristalleri deriden kolayca sızmaktadır (Eastman ve DeVries, 1986).

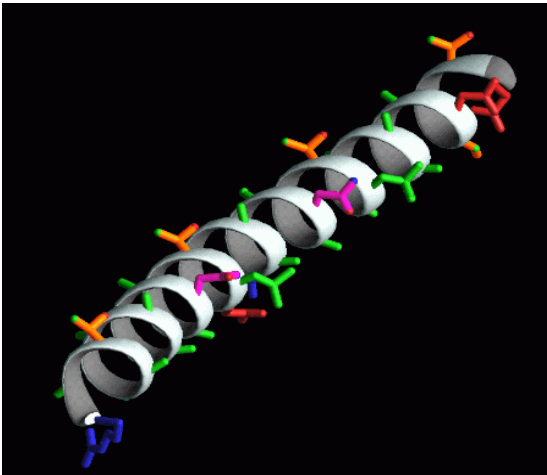
Antifriz moleküllerinin buza nasıl bağlandığı tam olarak bilinmemekle beraber antifrizlerin hidrokسيل grupları (-OH) ve diğer polar grupları amino asit zincirlerindeki karbonil (=CO-) grupları ile buza bağlandığı tahmin edilmektedir (Eastman ve DeVries, 1986).

Antifriz glikoproteinler (AFGP) ilk kez Antartik *Notothenioid*'lerde bulunmuştur. Bu antartik balıklarda farklı görevlere sahip iki gen bulunmaktadır. Birincisi pankreasta üretilen bir enzim olan tripsinojen için ikincisi ise balıkları donmaya

Tablo 2. Antifriz Proteinlerin başlıca özellikleri ve doğal kaynakları (Fletcher ve ark, 1999).

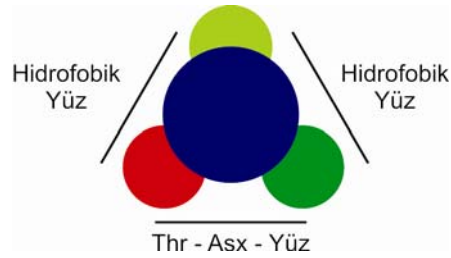
Özellik	AFGP	AFP		
		Tip I	Tip II	Tip III
Molekül ağırlığı, Da	2,600-33,000	3,300-4,500	11,000-24,000	6,500
Birincil Yapı	(alanin-alanin-threonin) _n disakkarit	Alanin zengin toplam 11 amino asit tekrarı	Sistin zengin, disulfid bağlı	Genel
Karbonhidrat	Var	Yok	Yok (Çamuka'da <3% karbonhidrat)	Yok
İkincil yapı	Genişletilmiş	α -Sarmal amfifilik	β -Tabaka	β -Sandwich
Üçüncül yapı	Tanımlanmamış	%100 sarmal	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
Biyosentez	Multiprotein	Prepro AFP	Prepro AFP (deniz aslanı)	Pro AFP
Protein içeriği	8	7	2 – 6	12
Gen Kopyası	Tanımlanmamış	80-100	15	30-150
Doğal kaynaklar	Antartik Notothenioidler, Kuzey kıyıları	Sağ Gözlü Derepisi (Kış Köpekdi), Kısaboynuzlu Sculpin	Deniz Aslanı, Çamuka, Ringa Balığı	Okyanus Somurtkan Balığı

Tip 1 Antifriz protein: Tip 1 AFP'leri, kış köpekdi (kemikli balıklar takımının yan yüzergiller ailesinden) ve kısaboynuzlu Sculpin'lerde bulunmaktadır. İlk kez bu balıklarda AFP'nin üç boyutlu yapısı açıklanmıştır (Duman ve DeVries, 1976).

Şekil 3. Tip 1 AFP'in α -Sarmal yapısı (Duman ve DeVries, 1976)

Tip 1 AFP'in birincil yapısı kararlı sarmal yapıdadır. Alanin'ce zengin birbirini tekrarlayan toplam 11 aminoasitten oluşmuştur. İkincil yapı, basit, uzun, amfipatik alfa sarmaldır (Şekil 3). Yaklaşık 3.3-4.5 kDa molekül ağırlığındadır. Üçüncül yapının tamamı sarmaldır. Tip 1 AFP'nin üç boyutlu yapısında üç adet yüz (hidrofobik, hidrofilik ve Thr-

Asx) bulunmaktadır (Şekil 4) (Duman ve DeVries, 1976)



Şekil 4. Tip 1 AFP'nin çevresiyle ilişkiye girebilecek yüzleri (Duman ve DeVries, 1976)

Tip 1 hiperaktif AFP bazı Sağgözlü Derepisi'nde (kemikli balık yan yüzergiller ailesi) bulunmaktadır. Yaklaşık 32 kDa ağırlığındadır (17kDa'luk iki monomer, bir dimerik molekül). Bu AFP donma ısısı düşük sularda bulunan balıklarda oldukça çok bulunmaktadır (Scotter, 2006). Tip 1 Antifriz proteinin buza tutunmasında hidrojen bağlarının büyük rol oynadığı, buza bağlanmada ısıyla ilgili en büyük yardımı da protein ile buz arasındaki Van der Waals etkisinin oluşturduğu düşünülmektedir (Sicheri ve Yang, 1995).

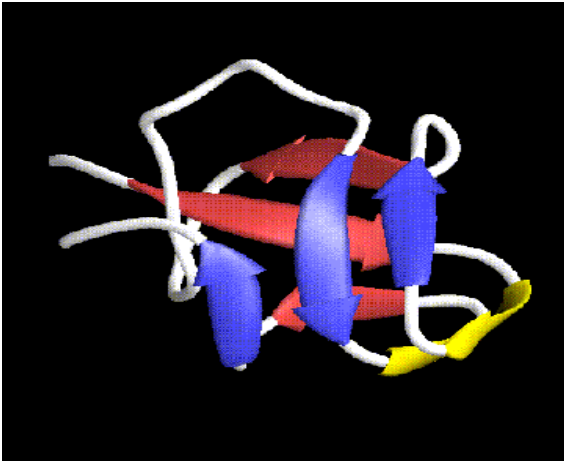
Tip 2 Antifriz protein: Deniz Aslanı'nda, Çamuka'da ve Ringa Balığı'nda bulunmakta olup yapısı tam olarak bilinmemektedir. Sistin'ce zengin bir globuler protein olup beş disulfid bağı içermektedir (Ng ve Hew, 1992). Molekül ağırlığı 11,000-

24,000 Da olup ikincil yapısı Tabaka yapıdan zengindir (Şekil 5), üçüncül yapısı ise henüz bilinmemektedir (Fletcher ve ark, 1999).



Şekil 5. Tip 2 AFP'nin ikincil yapısı (Anonim,1999)

Tip 3 Antifriz protein: Antartik Yılan Balığı'nda bulunan Tip 3 AFP'in molekül ağırlığı yaklaşık 6 kDa'dur. Buza bağlanma yüzeyinde gösterdiği hidrofob özelliği Tip 1 AFP ile aynıdır (Crevel ve ark, 2002). Tip 3 AFP'in birincil yapısı genel antifriz proteini yapısındadır. Tip 1 AFP'e benzer özelliktedir. İkincil yapısı -Sandwich modelde olup (Şekil 6), üçüncül yapısı bilinmemektedir (Fletcher ve ark, 1999).



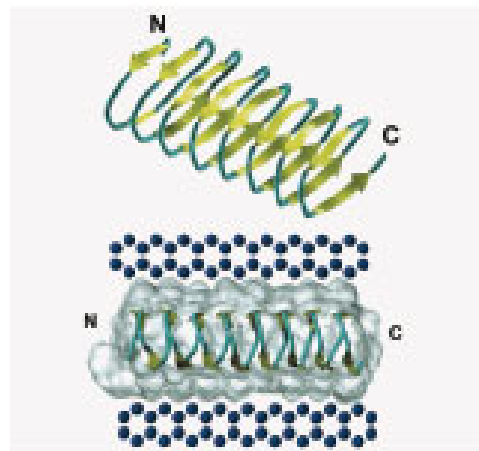
Şekil 6. Tip 3 AFP'in β -Sandwich modeli (Anonim,1999)

Tip 4 Antifriz protein: Tip 4 AFP Uzun Boynuzlu Sculpin plazmasında tespit edilmiş, alfa sarmal yapıda ve glutamat ve glutaminden zengin bir glikoproteindir (Deng ve ark, 1997). Diğer yapıları tam olarak bilinmemektedir (Fletcher ve ark, 1999).

Böcek antifriz proteini: Hiperaktif (yüksek termal histerez değerlerde) Antifriz protein olarak böceklerde bulunmuş bu protein Tip 5 Antifriz Protein olarak da adlandırılabilir (Graham, 1997).

Tenebrio ve Dendroides Antifriz Proteinleri diğer böcek ailelerinde bulunmaktadır ve yapıları birbirlerine oldukça benzemektedir. Bu Antifriz proteinlerin molekül ağırlıkları yaklaşık 8.3-12.5 kDa olup aminoasit dizisi boyunca, en az her altıda bir sistin rezidüsü yer alır (Duman, 2001). Kar Piresi'ndeki (*Hypogastrura harveyi*) AFP'lerin buza bağlanmasının diğer AFP'lere göre daha farklı olduğu keşfedilmiştir (Graham ve Davies, 2005). Bütün AFP'ler donma sırasında buza bağlanarak buz kristalinin büyümesini engellemektedir. Bu olay; kın kanatlı böceklerde ve güvede, buza threonin bölgesinden, kar piresinde ise glisin bölgesinden bağlanmak suretiyle gerçekleşmektedir. Glisin, protein yapısındaki esneklik ile ilişkilidir. Kın kanatlılarda (*Denroides canadensis*, DcAFP) tekrar eden disülfid bağlı 12-rezidü (TCTxSxxCxxAx) halkada Thr-Cys-Thr içeren bir buza bağlanma demeti içerir (Graham ve Davies, 2005).

Bitki antifriz proteini: AFP'lerin sınıflandırılması Bitki AFP'in keşfi ile daha karmaşık hale gelmiştir (Griffith, 1992). Bitki AFP'leri diğer AFP'lerden bazı yönlerden farklılık göstermektedir. Bunlar; diğer AFP'lere göre daha zayıf termal histerez (doğa olaylarının gelişmesindeki gecikme) aktiviteye sahiptir. Diğer AFP'lerin fizyolojik görevi buz oluşumunu önlemek iken Bitki AFP'leri tekrar kristal oluşumunu engellemektedir. Bitki AFP'lerinin çoğu patogenezi ilişkili proteinlerdir. Bazen antifungal aktiviteye de sahip olabilir (Griffith ve Yaish, 2004). Bitki AFP'in üç boyutlu yapısı, 118-rezidülü -sarmal yapıda 8 halkadan oluşan 14-15 aminoasitten ibarettir (Kuiper ve ark, 2001).



Şekil 7. Bitki Antifriz Proteinin β -Sarmal yapısı ve buz kristaline bağlanması (Kuiper ve ark, 2001)

Yaşlı karaçayır bitkisinin protein yapısının önemli bölümünü AFP oluşturmaktadır. Şekil 7’de Bitki AFP’in -sarmal yapısı teorik olarak gösterilmektedir. Birbirine paralel iki -tabaka bölgesinde sarı renkle gösterilen buza bağlanma alanları bulunmaktadır. Bu protein, aynı hizaya geldiği varsayılan iki prizma yüzeyi arasında (mavi bölge) buzun içeri girmesini önleyen, ara yüzey zıncığı gibi görev alır ve tekrar kristalleşmeyi önler (Kuiper ve ark, 2001).

Sonuç ve Öneriler

Antifriz proteinler (alanin-alanin-threonin)-galaktozil-N-asetil galaktozamin monomerlerinden oluşan polimerler olup buz kristaline bağlanarak kristalin büyümesini engellemek suretiyle canlıları donmaya karşı korurlar. Karaciğer ve deri kaynaklı olan AFP’ler Tıp, Gıda ve Endüstri alanlarında etkin biçimde kullanılmaktadırlar. Dokuların dondurularak korunmasında, kışın sert geçtiği bölgelerdeki ekinlerin donma noktasının düşürülmesinde, sıcak su balıklarının daha serin sularda üretilmesini ve adaptasyonunu sağlamada, dondurulmuş gıdaların raf ömrünü uzatmada, dondurma cerrahisinin (Kriyocerrahi’nin) gelişmesinde, tıpta transplantı veya transfüzyonu yapılacak dokuların daha iyi saklanmasında ve hipotermi tedavisinde olmak üzere farklı alanlarda yararlanılmaktadır. AFP’in buz kristallerinin oluşumunu engellemesi üzerine adının “Buz Şekillendirici Protein” olarak yeniden adlandırılması önerilmektedir.

Kaynaklar

1. **Crevel R.W.R., Fedyk J.K., Spurgeon M.J.** (2002). Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure (Review). *Food and Chemical Toxicology* 20, 899-903.
2. **Eastman J.T., Devries A.L.** (1986), Olağan Dışı Yaşamlar TÜBİTAK, Mart 1999 .
3. **Sidell B.D.** (2000) School of Marine Sciences, University of Maine, Orono ME Gravitational and Space Biology Bulletin 13(2).
4. **De Vries A.L., Komatsu S.K., Feeney R.E.** (1970). Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *J Biol Chem.* 245:11, 2901-8.
5. **Chen L, De Vries A.L.** (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 3811-3816, April 1997, Evolution.
6. **Fletcher G.L., Hew C.L., Davies P.L.** (2001). Antifreeze Proteins of Teleost Fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 359–90.
7. **Fletcher G.L., Goddard S.V, Wu Y.** (1999). Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunity. American Chemical Society, *Chemtech* 30(6),17-28.
8. **Duman J., Devries A.L.** (1976). Isolation, characterization and physical properties of protein antifreezes from the Winter Flounder *Pseudopleuronectes Americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* B54, 375–380.
9. **Scotter A.J.** (2006). The basis for hyperactivity of antifreeze proteins (Review). *Cryobiology* doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.06.06.
10. **Sicheri F., Yang D.S, Nature** 375:427-431, 1995.
11. **Ng N., Hew C.** (1992). Structure of antifreeze polypeptide from sea raven: Disulfide bonds and similarity to lectin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 267 (23): 16069-16075.
12. **Deng G., Andrews D.W., Laursen R.A.** (1997). Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein, from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *FEBS Lett.* 402:1, 17-20.
13. **Graham L.** (1997). Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature* 388, 727-728.
14. **Duman J.G.** (2001). Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 327–57.
15. **Graham L., Davies P.** (2005) *Biophysical Journal* Vol:88 (953-958).
16. **Kuiper et al,** (2001). A Theoretical Model of a Plant Antifreeze Protein from *Lolium perenne*, *Biophysical Journal*, Vol: 81, Sayı 6.
17. **Griffith M., Yash M.** (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* 9:8, 399-405.
18. **Griffith M.** (1992). Antifreeze Protein Produced Endogenously in Winter Rye Leaves. *Plant Physiology* 100:2, 593-596.
19. **Clarke C.J., Buckley S.L., Lindner N.** (2002) *Cryo Letters.* Mar-Apr; 23(2):89-92.

Toll benzeri reseptörler

Hamit Kaan MÜŞTAK¹, Ömer M. ESENDAL²

¹ Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara; ² Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Özet: Kalıp tanıma reseptörleri bakteriyel komponentlerin varlığını saptar ve invaze mikroorganizmaların eliminasyonu için oluşan yanıtı aracılık eder. Bu çok eski evrimsel bakteriyel tanıma sistemi *Drosophila* immün sisteminde de saptanmış ve Toll sinyal yolu olarak adlandırılmıştır. Yapılan çalışmalar *Drosophila* Toll'unun homologu olan memeli Toll Benzeri Reseptörleri'nin yangısal cevabın uyarılmasında anahtar moleküller olduklarını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Toll, reseptör, *Drosophila*, immün yanıt.

Toll like receptors

Summary: The pattern recognition receptors sense the presence of bacterial components and mediate responses for the elimination of invading microorganisms. This evolutionary ancient bacterial recognition system is found even in the *Drosophila* immune response, so called Toll signaling pathway. Recent studies revealed that mammalian Toll Like Receptors, homologues of *Drosophila* Toll, are key molecules for recognizing bacterial components to evoke inflammatory response.

Key words: Toll, receptor, *Drosophila*, immun response

Giriş

Toll Benzeri Reseptörler (TBR), deri veya bağırsak mukozası gibi doğal fiziksel engelleri aşarak vücuda girme şansı bulan mikroorganizmaları tanıyabilen ve onlara karşı bağışık bir konakçı yanıtı oluşturma yeteneğinde olan, tek membranlı, non-katalitik bir reseptör grubudur. TBR'lerin insan ve hayvanlardaki doğal bağışıklık sisteminde anahtar bir rol üstlendikleri kabul edilmektedir. Doğal bağışıklık sistemi insan ve hayvan vücudunda enfeksiyöz hastalıklara karşı şekillenen ilk savunma mekanizmasıdır. Bu savunma mekanizmasında konakçı vücudunda meydana gelen ilk ve en temel olay vücuda giren patojenin tanınması ve en kısa sürede bu patojene karşı hem yangısal hem de bağışık bir konakçı yanıtının oluşturulmasıdır. Omurgalı ve omurgasız tüm canlılarda Toll veya Toll Benzeri Reseptörler olarak adlandırılan ve protein yapısında olan bu reseptör grubu, söz konusu olayın şekillenmesinde temel rol oynar. Konakçı tarafından patojenin mümkün olan en kısa süre içinde tanınması ve ona karşı bağışık bir konakçı yanıtının oluşturulması enfeksiyonun patogenezisinde ve hastalığın prognozunda belirleyici olur.

Drosophila ve Toll

Toll ilk olarak *Drosophila* larvasının dorsal-ventral axisinin oluşumunu sağlayan mekanizmanın

esas komponenti olarak keşfedilmiştir. Toll, tip-1 transmembran reseptörü olup; ekstraselüler bölgesinde leusinden zengin tekrarlarla sahiptir. Toll'un sitoplazmik bölgesi ise memeli interleukin-1 reseptörünün (IL-1R) sitoplazmik bölgesine benzemektedir ve bu bölge Toll/IL-1R (TIR) homolog alanı olarak adlandırılmaktadır (14).

Drosophila ile yapılan genetik araştırmalar, Toll sinyal yolu için gerekli olan sinyal moleküllerinin varlığını ortaya koymuştur. Bunlar adaptör protein *Tube* ve *serine/threonine kinase Pelle*'dir. Toll bir antifungal peptit olan drosomisinin ekspresyonunu kontrol eder. Drosomisin geninin transkripsiyonunda bu moleküllerin izlediği yol, memeli IL-1R sinyal yolundaki moleküllerin izlediği yol ile benzerlik gösterir (11).

Drosophila'da Toll ailesine ait 6 üye tespit edilmiştir (7). Bunlardan 18-wheeler'ın bir antibakteriyel peptit olan atasının sentezini kontrol ettiği bildirilmiştir. Ayrıca *Drosophila*, farklı mikroorganizmaları farklı Toll sinyal yolları kullanarak ayırt edebilir. Farklı sinyal yollarının aktivasyonu belirli tip patojenlere karşı uygun antimikrobiyal peptitlerin üretimiyle sonuçlanır (11).

Toll benzeri reseptör ailesi

1997'de Toll Benzeri Reseptörleri (TBR) olarak adlandırılan Toll'un insan homologları keşfe-

dilmiştir (11). Bunlar, halen insan TBR1 ve insan TBR4 olarak isimlendirilmektedirler. Günümüze kadar 10 insan ve 9 faregillere ait transmembran proteininin memeli TBR ailesine ait olduğu saptanmıştır (14).

TBR'nin yapısı

IL-1R'nin sitoplazmik porsiyonu ile *Drosophila* Toll'unun sitoplazmik porsiyonu birbirine benzerlik gösterir ve bu alana TIR alanı denir. Ancak IL-1R aile üyeleri ekstraselüler alanlarında 3 immunoglobulin benzeri bölge içerirler (12). Toll ailesinin bütün üyeleri membran proteinleridir ve ekstraselüler alanlarında ise leusinden zengin tekrarlara (LRR) sahiptirler. Toll ailesi proteinlerinin ekstraselüler kısmı geniştir (550-980 aminoasit) ve muhtemelen birden çok bağlayıcı bölgeye sahiptir (3). Aynı zamanda bu ekstraselüler alan küçük, sistinden zengin bölgeleri de içerir. Ancak sayı ve düzen açısından bu sistinden zengin alanlar Toll ailesi üyeleri arasında farklılık gösterir (4). LRR'ler 20-29 aminoasitlik kısa protein modülleridir ve TBR proteinlerine ek olarak çeşitli protein gruplarında (CD14, RP105, NOD) da bulunurlar (12). Bunlardan RP105'in ekstraselüler LRR alanı insan Toll'u ile benzerlik gösterir. RP105'in ligandı halen bilinmemekle beraber RP105, ekspresyonu için MD-1 diye adlandırılan başka bir moleküle ihtiyaç gösterdiği bilinmektedir (4). TBR'ler sitoplazmik bölgelerinde yaklaşık 200 aminoasitten oluşan ve IL-1R ile benzer TIR alanına sahiptirler (3). Bu TIR alanı ek olarak 2 protein tipinde daha bulunur: birincisi, bir sitoplazmik protein olan miyeloid diferansiyasyon faktör 88 (MyD88), karboksiterminal TIR alanına ve amino-terminal bölgesine sahiptir. İkincisi ise birkaç bitki hastalık-direnç proteinini kapsar (örn. RPP5)(4).

TBR ailesi üyeleri

TBR1: Günümüze kadar TBR1'e özel direkt bir ligand saptanamamasının yanında fonksiyonu da halen açıklığa kavuşmamıştır. Fareler ile yapılan çalışmalar TBR1'in TBR2 ile fonksiyonel olarak ilişkili olduğunu ve lipopeptidler arasındaki çok ufak farklılıkların ayırımında TBR1'in TBR2'ye yardımcı olduğunu göstermiştir (10).

TBR2: Lipoproteinler ve lipoteikoik asitler (LTA), Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan (PGN) tabakasına gömülü vaziyette bulunurlar. TBR2 farklı mikrobiyal

komponentleri tanıyabilir. Bunlar: *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterilerin PGN tabakası, Gram negatif bakterilerden *Borrelia burgdorferi* ve *Mycoplasma fermentans*, birçok bakterinin lipoproteinleri ve lipopeptitleri, *Trypanosoma cruzi*'nin glikofosfatidilinositol'ü, *Mycobacterium tuberculosis*'in lipoarabinomannanı ve mayaların hücre duvarı komponenti olan zimosandır (1, 2). Aynı zamanda leptospiral lipopolisakkaride (LPS) karşı TBR2'den yoksun farelerle yapılan çalışmalarda hücrelerde yangısal cevap oluşmazken diğer LPS'ler bu hücreleri normal olarak stimule edebilirler. Yapılan çalışmalar, LPS-reseptör kompleksi oluşturmak üzere TBR2'nin CD14 ile etkileştiğini göstermiştir (2, 13). Leptospiral LPS'ye cevap oluşturamayan hücrelerde yapılan son çalışmalar hem CD14'ün hem de TBR2'nin cevap için stimülasyonu sağlamada gerekli olduklarını ortaya koymuştur. Benzer olarak *Porphyromonas gingivalis*'in LPS'si diğer Gram negatif bakterilerden farklıdır ancak bu da CD14 ve TBR2 tarafından tanınmaktadır (13). İn vitro çalışmalar LTA'nın, ve bir çalışmada da, *Listeria monocytogenes*'in TBR2 ile hücreleri aktive ettiğini göstermiştir. Bazı yazarlara göre, bu kadar birbirinden farklı ligandı bağlayan TBR2'nin bu yeteneğini, diğer TBR'lerle; özellikle TBR6 ve TBR1 ile oluşturduğu heterodimerlerden aldığına dayandırmışlardır (14). TBR2 diğer TBR'leri fonksiyonel heterodimer oluşturarak spesifikite repertuarını genişletir. TBR2/6 heterodimerinin, PGN ve zimosan'ı tanıdığı ortaya konmuş ancak TBR2'nin, bakteriyel lipoproteinleri birlikte tanıdığı heterodimeri halen bulunamamıştır (2). Akira ve arkadaşları (15), mikoplazmadan elde edilmiş bir diasile lipoprotein olan MALP-2'nin tanınmasında TBR2 ve TBR6'ya mutlak gereksinim olduğunu saptamışlardır (13).

TBR3: İnfekte hücrelerde viral replikasyon, immun sistem hücrelerini stimule edebilen çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) oluşması ve tip 1 interferon'un indüklenmesiyle sonuçlanır. dsRNA konakçı hücrenin ögesi olmadığı için patojen ilişkili moleküller kalıp (PAMP) gibi düşünülebilir. TBR3'den yoksun farelerde yapılan çalışmalarda viral RNA kopyasına karşı oluşan cevapların azalması, TBR3'ün dsRNA'nın tanınmasında rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca protein kinaz R gibi diğer moleküllerin dsRNA'nın neden olduğu interferon üretimine aracılık ettiği ileri sürülmüştür (2, 14).

TBR4: LPS, Gram negatif bakterilerin dış membranlarında bulunan kuvvetli bir makrofaj aktivatörü ve endotoksik şok oluşturucu ajanıdır (1). Makrofajların LPS ile stimülasyonu TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, makrofaj inflamasyon protein-1 α/β gibi çeşitli sitokinlerle; prostanooidler, lökotrienler ve nitrik oksit gibi yangısal efektör substansların üretimiyle sonuçlanır. Kan dolaşımındaki LPS, karaciğerde yapılan ve akut faz proteinlerinden biri olan LPS bağlayıcı protein (LPB) tarafından hemen yakalanır (2). Bu protein spesifik lipid transfer proteini ve LPS'yi CD14'e teslim eder (1). Hücre yüzeyinde yerleşen LPS/LPB/CD14 üçlü kompleksi mitojen-aktive edici protein kinaz (MAPkinaz) ailesine ait bazı üyelerin ve transkripsiyonel faktör NF- κ B'nin aktive olmasını sağlar. CD14 hücre yüzeyi glikoproteinidir ve LPS için bağlayıcı reseptör olarak görev yapar. Fibroblastlar ve endotelial hücreler gibi CD14'ten yoksun hücrelerde, serumda çözülmüş halde bulunan CD14 membrana bağlı olan CD14'ün yerine geçerek fonksiyon gösterebilir (2). CD14 mononükleer fagositlerin yüzeylerinde bulunur (1). Ancak CD14 intrasitoplazmik bölgeye sahip değildir (14). CD14'ün sinyal transdüksiyonunu gerçekleştirememesine sebep olan bu durum diğer moleküllerin LPS sinyalinden sorumlu olduğunu gösterir (1). Poltorak ve arkadaşları (16), LPS sinyalinin TBR4 tarafından iletiltiğini bulmuşlardır (14). TBR4'ün bu fonksiyonu, farelerde LPS'nin tanınmasından sorumlu olan genin pozisyonel klonlanmasıyla ortaya konmuştur (12). CD14, TBR4 ve bir ekstraselüler aksesör protein olan MD-2 kompleksiyle birleşir. Bu kompleksteki her komponent etkin bir LPS sinyal uyarımı için gereklidir. MD-2'nin transmembran parçası olmadığından, hücre ile etkileşimi TBR4'ün ekstraselüler parçasıyla kurar (13).

LPS'nin dışında çeşitli komponentlerin de TBR4 ligandı olduğu saptanmıştır. Bir bitkiden elde edilen *taxol* isimli antikanser ajanı farelerde LPS'nin hareketini taklit eder. İnsanda böyle bir durum söz konusu değildir. Fare ve insan arasındaki MD-2'deki farklılığın türlerdeki bu spesifikiteyi belirleyen unsur olduğu anlaşılmıştır (12).

TBR4 tarafından tanınan diğer bir yabancı yapı *Respiratory Syncytial Virus*'un füzyon proteini (F protein). F proteinini, monositler ve makrofajlar tarafından kuvvetli sitokin üretimine neden olur. Bu durumun CD14 ve TBR4'ten yoksun farelerde

oluşmaması, CD14-TBR4 kompleksinin yanıtı aracılığı ettiğini gösterir. MD-2'nin bu stimülustaki rolü henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (13).

TBR4'ün endojen molekülleri de bağladığı bildirilmiştir (14). Bunlardan bir tanesi TBR4 aracılığıyla yangısal cevabı uyaran ısı şok protein 60 (HSP60)'dır. TBR4'ten yoksun fare hücrelerinde, HSP60'a karşı oluşan immün yanıtta azalma görülmüştür. Yanıt alınamayan hücrelerde MD-2'nin TBR4 ile beraber eksprese edilmesi yeterli bir yanıtın oluşumunu sağlar. Vabulas ve arkadaşları (17), yanıt oluşturamayan hücrelerde TBR2'nin ekspresyonu ile yeterli yanıtın alındığını ortaya koymuşlardır. Bu durum her iki TBR'nin de HSP60'ı tanıyabildiğini ve farklı hücre tiplerinin farklı reseptörleri kullandığını ortaya koymuştur.

Fibrinojen, bakteriyel fimbria ve teikuronik asit gibi diğer proteinlerinde TBR4 ile immün sistem hücrelerini aktive ettikleri saptanmıştır. Ancak bunların tanınmasındaki TBR4'ün rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır (13).

TBR5: TBR2, TBR4 ve TBR6 birden çok bakteriyel ürün aracılığıyla stimüle edilirlerken; TBR5 ve TBR9'un stimülasyon için yalnız bir mikrobiyal hedefe gereksinim duydukları anlaşılmıştır (13). TBR5 bakteriyel flagellanın 55kDa'luk monomeri olan flagellini tanır (1). Flagellin aynı zamanda kuvvetli bir pro-inflamasyon faktörüdür (2). TBR5'in flagellin tarafından aktivasyonu TNF- α gibi yangısal medyatörlerin üretimini stimüle eder. Bu durumda diğer TBR'lerin de ortak olarak kullandığı IRAK ve MyD88 gibi sinyal molekülleri kullanılır (13). TBR5 intestinal epitelin *basolateral* yüzeyinde eksprese edilir. Bu yüzden flagellinin pro-inflamasyon gen ekspresyonunu aktive edebilmesi için intestinal epitelin *basolateral* membranla kontak kurması gerekmektedir (1).

TBR6: TBR6, TBR1 ve TBR2 ile yakından ilişkilidir. Ozinsky ve arkadaşları (18), Çin hamster ovarium hücrelerinde TBR2 ile TBR6'nın ilişkili olduğunu göstermişlerdir. TBR6'dan yoksun makrofajlarda *Staphylococcus aureus*'un peptidoglikanına karşı belirgin TNF- α üretimine rastlanmıştır. Buna karşın TBR6'dan yoksun makrofajlar mikoplazmal lipopeptit MALP-2'ye karşı cevap oluşturamazken, sentetik bakteri lipopeptidine (BLP) karşı cevap olarak normal sitokin üretimi gösterirler. TBR2'den yoksun fareler ise MALP-2'ye de BLP'ye de cevap veremezler.

MALP-2 ve BLP aminoasit sekans farklılığı gösterir; BLP N-asil S-asil sistine sahipken MALP-2 diasile sistine sahiptir. TBR2 ve TBR6 MALP-2'yi birlikte tanırlarken; TBR6, MALP-2 ve BLP arasındaki küçük yapısal farklılığın tanınmasından sorumludur. TBR1 ve TBR10, TBR6 ile benzerlik gösterdiğinden bunlar TBR2'nin partneri olmaya adaydır (12). Yapılan araştırmalar TBR2 ve TBR6'nın inhibisyonunun mayalara (zimosan) ve Gram pozitif bakterilere (peptidoglikan) karşı oluşan makrofaj yanıtını bloke ettiğini göstermiştir. Bu durum bu komponentlerin TBR2 ve TBR6 tarafından tanındığını gösterir (13).

TBR7: TBR7 *imidazoquinoline* ailesinin birkaç tipini tanıır. *İmiquimod* (Aldara, R837, S-26308 olarak da bilinir) ve R-848 (resiquimod, S-28463 olarak da bilinir) *imidazoquinoline* ailesinin düşük moleküller kütleyle sahip bileşikleridir. Aynı zamanda kuvvetli antiviral ve antitümör özelliklerine sahiptirler. *İmiquimod*'un aktivitesi IFN- α ve IL-12 gibi sitokinleri uyarma yeteneğine dayanır. Topikal *imiquimod* terapisi halen papilloma virusların neden olduğu, eksternal genital ve perianal siğillerin tedavisinde uygulanmaktadır. R-848 ise *imiquimod*'un kuvvetli bir analogu olup halen geliştirilmektedir. Bunlara ek olarak TBR7, *loxoribine* ve *broprimine* gibi diğer sentetik kimyasalları da tanıdığı gösterilmiştir (1).

TBR8: TBR8, TBR7 ile beraber bir *imidazoquinolin* bileşiği olan R-848'e karşı oluşan immün yanıtta rol aldıkları ortaya konmuştur. (6).

TBR9: TBR9, bakteriyel DNA (ve viral DNA) ve anetile CpG dinükleotidlerini (CpG-DNA) içeren sentetik oligodeoksinükleotidlerin tanınması için gereklidir. Bu oligonükleotidlerin B hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği ve makrofajlar ile dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Optimal immünstimülasyonu sağlayan CpG-DNA motifi fare ve insan arasında farklılık gösterir. Bu fark, insan ve fare TBR9'larının ekstraselüler bölgelerindeki aminoasit sekans farklılığından kaynaklanır (1).

TBR10: TBR10 insan TBR ailesinin son üyesi olup fonksiyonu ve direkt ligandı halen bilinmemektedir (6).

TBR sinyali yolu

TBR'ler, ekstraselüler kısımlarındaki leusinden zengin tekrarların bulunduğu alan ile ve

sitoplazmik kısımlarındaki, IL-1R'nin intrasellüler kısmına olan önemli benzerlikleriyle karakterizedir. Bu gözlemler, benzer olan sitoplazmik alanların sinyali için ortak moleküller kullanabileceğini göstermiştir.

IL-1, nükleer faktör κ B (NF- κ B) gibi, sonradan bazı sitokin genlerinin transkripsiyonel indüksiyonunu sağlayan farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu uyarır. IL-1'e bağlandıktan sonra, IL-1R ve IL-1R aksesör protein (IL-1RacP) çifti ve bunların uygun sitoplazmik porsiyonları aktif IL-1R sinyali kompleksini oluşturmak üzere bir araya gelir. Bu kompleks, adaptör protein MyD88 ve IL-1R ilişkili kinaz (IRAK) ve IRAK-2 olarak adlandırılan iki *Serin/Threonin* kinazı kapsar. IL-1R ve IL-1RacP'nin intrasellüler kısımlarındaki benzer alanlar adaptör MyD88 ile homofilik etkileşim kurarak bağlanırlar. MyD88 modüler bir yapıya sahiptir: TIR modülü olarak adlandırılan ve IL-1R'ye bağlanan C-terminal alanı ve ölü-bölge modülü olarak bilinen N-terminal porsiyonu. MyD88'in ölü-bölge modülü, IRAK ve IRAK-2'yi IL-1R sinyali kompleksine dahil eder. İleri basamaklarda IRAK ve IRAK-2, adaptör molekül tümör nekrozis faktör reseptör-ilişkili faktör 6 (TRAF6) ile etkileşerek, protein kinaz TAK1 (*transforming growth factor-beta-activated kinase*) ve NIK (NF- κ B-uyarıcı kinaz) ile bağlanır. NIK en son olarak inhibitör κ B (I κ B) kinaz (IKK) kompleksini aktive eder. Bu kompleks ise I κ B α 'nın direkt fosforilasyonuna neden olur (9).

TBR'ler tarafından aktive edilen intrasellüler sinyali yolları IL-1R sinyali ile birçok ortak nokta taşır. Bunun sebebi aralarındaki benzer TIR homolog alanının varlığıdır. PAMP'ın bir TBR'ye bağlanması TIR'ın aktivasyonuna neden olur (13). Sinyali, adaptör protein MyD88'den başlar. MyD88, TBR'nin sitoplazmik kuyruğuyla birleşir ve MyD88'in ölü-bölgesi IRAK ile homofilik etkileşimle bulunarak bu molekülü reseptöre bağlar (ancak IRAK2 ile bağlanmaz (8)). Aktive olan IRAK reseptörden bırakılır. IRAK, TRAF6'ya bağlanarak aktivasyonunu sağlar (12). TRAF6, NIK (mitojen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK veya MAP3K) aile üyesi (4)) ile bağlantı kurarak, IKK kompleksini stimüle eder. Aktive olan IKK kompleksi, I κ B'yi fosforilize eder. Böylece proteazom-aracılı I κ B degradasyonu şekillenir. I κ B'nin degradasyonu, NF- κ B'yi serbest bırakarak sitozolden nükleusa transloke olmasını ve pro-

inflamasyon sitokinlerinin ekspresyonunu sağlar (12).

Bazı LPS-uyarımlı cevapların MyD88'e ihtiyaç göstermediği gözlemlenmiş ve buna dayanarak başka bir TBR sinyal yolunun var olabileceği düşünülmüştür. MyD88'den yoksun hücrelerde NF- κ B aktivasyonunun gecikmiş de olsa gözlemlenmesi, ancak TBR4'ten yoksun hücrelerde NF- κ B aktivasyonunun tamamen baskılanmış olması MyD88-bağımsız bir yolun varlığını ortaya koymuştur. LPS-uyarımlı DC maturasyonu MyD88'e gereksinim göstermediği halde TBR4'e ihtiyaç gösterir. Buna ek olarak TBR9 aracılığıyla CpG DNA tarafından uyarılan DC maturasyonunun MyD88'den yoksun hücrelerde şekillenmemesi, diğer TBR'lerin değil sadece TBR4'ün sinyal molekülleriyle etkileşim kurduğunu göstermiştir. Son zamanlarda iki farklı grubun yapmış olduğu çalışmalar yeni bir molekülün varlığını ortaya koymuştur. Bu moleküle TIR alanı içeren adaptör protein (TIRAP) veya MyD88 adaptör benzeri (MAL) ismi verilmiştir. Bu molekülün spesifik olarak TBR4 ile etkileştiği ve MyD88 bağımsız sinyal yolundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. İki grubunda gerekçesi, TBR'lerin ve MyD88'in ortak TIR alanları vasıtasıyla etkileşmeleri ve bu adaptör molekülünde aynı TIR alanına sahip olması nedeniyle aynı durumun söz konusu olabileceğidir. TIRAP/MAL, IRAK-2 ile direkt ilişki kurarken IRAK-1 ile ilişki kuramaz ancak MyD88 her iki kinazla da ilişki kurabilmektedir (13). Böylece TIRAP/MAL, IRAK-2 ile ilişki kurarak NF- κ B aktivasyonuna yol açar (14).

Son yapılan çalışmalar MyD88 bağımsız yolun, interferon (IFN) düzenleyici faktör 3 (IRF3)'ün aktivasyonundan, IFN- β 'nin ve IFN-uyarılabilir genlerinin indüksiyonundan sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (1). MyD88'den yoksun farelerde LPS uyarımıyla IRF3'ün nükleer translokasyonu, IRF3 aktivasyonunun MyD88 bağımsız yolla ilişkili olabileceğini göstermiştir (14). MyD88 bağımsız yolla IRF3 aktivasyonunda TIRAP/MAL'ın da rolü olabileceği araştırılmaktadır (2).

Yapılan araştırmalara göre, TIRAP/MAL'ın MyD88 bağımsız yolu kullanarak NF- κ B aktivasyonunu yönettiği ve bunu da çift iplikçikli RNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR) ve TBR4 ile ilişki kurarak gerçekleştirdiği saptanmıştır (12).

Sonuç olarak, insan ve hayvanlarda infeksiyonlara karşı vücutta şekillenen doğal bağışıklık mekanizmasının önemli komponentlerinden biri olan ve aynı zamanda infeksiyonların patogenezi ve prognozlarında regülatör görev üstlenen Toll Benzeri Reseptörlerin yapı, görev ve fonksiyonlarının iyi bilinmesi yukarıda sözü edilen konulardaki soru işaretlerine yanıt vererek infeksiyon olgusundaki bilinmeyenlere açıklık kazandıracaktır.

Kaynaklar

1. Akira, S. (2003): Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 5-11.
2. Akira, S., Hemmi, H. (2003): Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett.* 85(2): 85-95.
3. Anderson, K.V. (2000): Toll signalling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 13-19.
4. Kopp, E.B., Medzhitov, R. (1999): The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 13-18.
5. Krutzik, S.R., Sieling, P.A., Modlin, R.L. (2001): The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 104-108.
6. Li, X., Qin, J. (2005): Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J. Mol. Med.* 83: 258-266.
7. Means, T.K., Golenbock, D.T., Fenton, M.J. (2000): Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sci.* 68: 241-258.
8. Muzio, M., Mantovani, A. (2000): Toll-like receptors. *Microbes Infect.* 2: 251-255.
9. Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P.P., Mantovani, A. (2000): Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 28(5): 563-566.
10. Takeda, K., Akira, S. (2004): Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34: 73-82.
11. Takeuchi, O., Akira, S. (2001): Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacology.* 1: 625-635.
12. Takeuchi, O., Akira, S. (2002): Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes Infect.* 4: 887-895.
13. Underhill, D.M., Ozinsky, A. (2002): Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 103-110.
14. Werling, D., Jungi, T.W. (2003): TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91: 1-12.
15. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlrardt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S.

- (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13: 933-940.
16. **Poltorak, A., He, X., Smirnova, L., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M.** (1998): Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 282:2085-2088.
17. **Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Hacker, H., Wagner, H.** (2001): Endocytosed hsp60s use Toll-like receptor 2 (tlr2) and tlr4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276:31332-31339.
18. **Ozinsky, A., Smith, D., Hume, D., Underhill, D.M.** (2000): Co-operative induction of pro-inflammatory signalling by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 6: 393-396.

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi

Yayın Koşulları

1. Dergi, TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda bir yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg." dir.

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

3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler kolay okunabilir yazı karakterinde (Times New Roman, Ariel), düz metin olarak, çift aralıklı (5 mm) ve kenarlarda yeterince boşluk (30 mm) bırakılarak, 12 pt kullanılarak, A4 (210 x 297 mm) formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.

4. Yazılar, yayın kuruluna iki kopya şeklinde gönderilmelidir. İkinci kopya hakeme gönderileceğinden yazar adı ve yazara ait bilgiler bulunmalıdır. Yazılar tercihen Microsoft Word formatında olmalıdır. Çalışma ile ilgili fotoğraflar ayrı bir dosyada JPG halinde CD ile gönderilmelidir.

5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmalarda, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç bölümlenmesi yapılmaz.

Konu başlığı, kısa ve açık olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır. Çalışmaya ilişkin açıklama dipnot işareti ile gösterilmelidir.

Yazar/yazarlar, ad ve soyadları ile belirtilmelidir; soyadları büyük harflerle yazılmalıdır.

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

Başlık

Makale başlığı (Türkçe ve İngilizce dil ile kısa ve konu hakkında bilgi verici olmalıdır). Çalışmaya ilişkin açıklama dipnot işareti ile gösterilmeli ve yazar adlarından önce yazılmalıdır.

Yazar(lar)ın ad(lar)ı ve soyad(lar)ı (Yazar adlarında ve alttaki açıklamalarda unvan kullanılmamalıdır) yazılmalıdır.

Yazarların açık iş adresleri (Yazarların çalıştıkları kurumlar, adın sonuna konacak bir yıldız işareti ile 1. Sayfanın altına not şeklinde yazılmalıdır).

Birden çok yazarı olan bir yazıda, yazarlar aynı kurumda çalışıyorlarsa, adları sıralandıktan sonra kurumun adı yalnız bir defa yazılır. Aynı yerlerde çalışan yazarlar söz konusu ise, yazar adlarının üzerine konulacak açıklama işaretleri ile bu ayrım belirtilir. Eğer yazar bu araştırmanın yapıldığı yerden ayrılmış, kurum değiştirmişse, çalışma için en uzun süre geçirilen kurum yazılır. Ancak, o yazarın en son bulunduğu kurumun ismi de parantez içinde yazılmalıdır.

Kısa Başlık, yazının iç sayfalarının üstünde kullanılacak olan, makaleyi en iyi ve kısa şekilde ifade eden başlıktır. Bu başlığın yazarlar tarafından seçilmesi daha uygun olur.

Özet

Her makalenin mutlaka Türkçe ve İngilizce dilde özeti olmalıdır. Özet, tek paragraf halinde Türkçe ve İngilizce dilde en az 200 en fazla 500 sözcük olmalıdır. Her makalede Türkçe özet sonunda Türkçe, İngilizce özet sonunda, İngilizce anahtar kelime verilmelidir. Anahtar kelimeler (key words) 5 kelimeyi geçmemelidir. Türkçe ve İngilizce dilde anahtar sözcükler, alfabetik sıraya göre yazılmalıdır. Uluslararası ortamda ilgi çekebilmesi için, özet konuya hakim olmalı ve makalenin önemli noktalarını (ne yapıldığını, nasıl yapıldığını ve amacını) vurgulamalıdır.

Giriş

Giriş olanaklar ölçüsünde kısa tutulmalı ve konu ile ilgili bilgileri içermelidir. çalışma ile doğrudan ilgili kısa literatür bilgisi verildikten sonra, son paragrafta çalışmanın amacı vurgulanmalıdır. Bu bölüm 2 sayfayı geçmemelidir.

Materyal ve Metot

Çalışmanın, başka araştırmacılar tarafından tekrarlanabilmesine olanak sağlamak için, kullanılan metotlar (istatistikî analiz metotları dâhil) açıkça tarif edilmeli, ancak, standart metotlar, kapsamlı açıklamalara girmeden kaynak verilerek gösterilmelidir. Materyal ve Metot, ayrıntıya girilmeden, öz ve anlaşılır biçimde yazılmalıdır.

Materyal ve Metot ile Bulgular bölümlerinde, alt başlıklar önce kalın, sonra italik yazı tipiyle belirtilmelidir. Kalın alt başlık sol kenarda, italik alt başlık ise paragraf başında yer almalıdır.

Tablo ve şekil başlıkları, Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır.

Bulgular

Bulgular bölümünde, veriler kısa bir şekilde açıklanmalıdır. Tablolarda verilen bulguların metinde tekrarlanmasından kaçınılmalıdır.

Veriler çalışmanın amacını vurgulayacak bir şekilde sunulmalıdır (Bu bölümde literatür bilgileri sunulmaz).

Bu bölümde şekil ve tablolarla anlatım metin ile anlatımdan daha anlaşılır bir durumdaysa bulgular şekil ve tablolarla verilmelidir. Tablo ve şekil başlıkları Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır.

Çalışmada kullanılan tablo ve şekillerin boyu 16-20 cm den büyük, genişliği 8 cm den küçük olmamalıdır. Tablo, şekil ve grafikler ayrı bir sayfaya yapılmalı, yazının içine gerekmiyorsa konulmamalıdır. Basım sırasında yazı içinde tablo, şekil veya grafiğin gelmesi istenen yere örneğin; "Tablo 1, (Şekil 1, Grafik 1) buraya gelmeli" yazısı, altına ve üstüne çizgi konularak yerleştirilmelidir. Tablonun açıklamasını içeren yazı tablonun üstüne yazılmalıdır. Metin içinde tablo, şekil veya grafikten mutlaka söz edilmelidir.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada alınan sonuçların daha önceki çalışma verileriyle karşılaştırıldığı ve yorumlandığı bölümdür. Veriler literatür bilgilerinin ışığında tartışılmalı ve yorumlanmalıdır. Bu bölümde bulguların ve giriş bölümünde verilen literatür özetlerinin tekrardan kaçınılmalıdır. Ayrıca, yapılan çalışmanın literatüre olan katkısı da kısaca açıklanmalıdır.

Kaynaklar

Kaynak listesi alfabetik sıraya göre düzenlenir. Metin içerisinde her kaynağa ait yazarın soyadı büyük olarak yazılmalı ve yayının tarihi belirtilmelidir. Kaynak ikiden çok yazarlı ise, ilk yazarın soyadı yazılmalı, öteki yazarlar "ve ark." kısaltması ile belirtilmelidir. Metin içerisinde kaynak kullanımında, aynı konuyu bildiren 1'den çok kaynak varsa bunlar tarih sıralamasına göre bildirilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

- ◆ Yazar(lar)ın soyad(lar) ile ad(lar)ının ilk harfi büyük ve kalın yazılmalıdır.
- ◆ Yayının tarihi belirtilmeli, yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına a ve b şeklinde belirtilmelidir.
- ◆ Makalenin adı İtalik yazı karakteri ile yazılmalıdır.
- ◆ Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır.
- ◆ Cilt ve sahife numaraları yer almalıdır.

1. Süreli Yayın

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N.caninum in cattle.* J Am Vet Med Ass. 201 (5), 709-713.

2. Yazarlı Kitap

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

3. Editörlü Kitap

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

4. Editörlü Kitapta Bölüm

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

5. Kongre Bildirileri

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

6. Tezler

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

- ◆ Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayınlanır.
- ◆ Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.
- ◆ Düzeltmesi için geri gönderilen yazıların en geç 15 gün içerisinde tekrar yayın kuruluna ulaştırılması gereklidir.

- ◆ Yayınlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.
- ◆ Ayrı basım istenmesi durumunda ücretleri yazarlar tarafından ödenir.
- ◆ Tablo ve şekil başlıkları, Türkçe ve yabancı dilde yazılmalıdır.
- ◆ Kısaltmalar, semboller ve ölçüler: Yazarlar her bir bilimsel kısaltmanın açılımını metinde ilk geçtiği yerde açıklamalıdır.
- ◆ Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Systeme Internationale)'ye göre verilmelidir.
- ◆ Çok yazarlı çalışmalarda yazışma adresi olarak yazarlardan sadece birinin adı belirtilmelidir.
- ◆ Dergide yayımlanmak üzere gönderilen makaleler tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ile birlikte gönderilmelidir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, istendiğinde Yayın Komitesi'nin basıma ilişkin kararı, yazarına/yazarlarına bildirilir.
- ◆ Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde yayımlanacak olan, hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır.
- ◆ Dergide yayımlanan her türlü makalenin sorumluluğu yazarlarına aittir.
- ◆ Ürünlerin ticari adları ile karşılaştırılmalarına yönelik araştırmalar derginin ilgi kapsamı dışındadır.
- ◆ Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

Etlik Journal of Veterinary Microbiology

Publication Conditions

1. The Journal is a refereed, scientific publication of Turkish Republic of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Directorate of Etlik Central Veterinary Control and Research Institute and is published annually. The short name of the journal is "Etlik Vet. Milrobiyol. Derg".

2. In the Etlik Journal of Veterinary Microbiology, original scientific researches on the issue of Veterinary Medicine whose one part or whole have not been published in any other place before, up-to-date editions, observations, short scientific studies and news from the Institute are published. The edited papers will be accepted only if they are original, including latest happenings and not repeating the classical knowledge. The author who prepares the edition is asked to possess original publications or researches at national or international levels.

3. The papers that will be prepared in the languages of Turkish and English should be typed in an easy-reading typing character (Times New Roman, Ariel) at size of 12 pt, be composed as a full text, double-spaced (5 mm) and with enough space in both sides of the paper (30 mm) and by using a white paper of A4 dimension (210x 297 mm). The whole of the paper should not exceed 16 pages for original scientific researches including the figures and the tables, 10 pages for edited papers, 6 pages for observations and 4 pages for short scientific studies.

4. Two copies of the papers should be sent to the edition board. As the second copy will be sent to the referee, information about the author and the author name should not appear on the paper. The articles are preferred to be written in Microsoft Word format. The photographs related with the studies should be sent separately in the form of JPG with a CD.

5. The Turkish original studies should include in rank, title, name(s) of the author(s), their addresses, abstract in Turkish and keywords, title in English, abstract in English and keywords, introduction, material and method, findings, discussion and conclusion, acknowledgements and reference. In short scientific studies, the paper is not cut into sections like introduction, material and method, findings, discussion and conclusion.

Title should be short, open and be composed with small caps. The explanation about the study should be mentioned with a footnote sign.

Author/authors should be mentioned by their names and surnames; their surnames should be written in capital letters.

6. Original studies and observations should be arranged and composed as in the following.

Title

Title should be both in Turkish and English languages and should be short and informative about the issue at hand. General explanation about the study should be provided with a footnote sign and be written on the line before the author names.

The names and surnames of the authors should be written (In author names and footnote explanations, one's title should not be mentioned).

Open address of the authors should be written (authors' institutions should be written at the end of the first page as a footnote signed out with a sign of star put at the end of their name).

In an article with more than one author, if the authors work in the same institution, after citing their names, the institution's name is mentioned only for one time. If authors work in different places, with the help of explanation signs that are put on top of the author names, this difference is singled out. If the author does no more work in the institution where this research has been conducted, and has started to work in a different institution, the name of the institution where the author has spent more time for this study is mentioned. However, the name of the latest institution of the author should be written within parentheses.

Short title that will be used on top of the inside pages of the text is the title that presents the article in the best and shortest ways. It is better that the authors choose this title.

Summary

Each article should possess abstracts both in Turkish and English. Abstract should be in both of the languages at least about 200 words and at most about 500 words, composed in a single paragraph. In each article, there should be Turkish keywords at the end of the Turkish abstract and English keywords at the end of the English abstract. Keywords should not exceed 5 words. The keywords in Turkish and English should be written in alphabetical order. The abstract should be mastering the subject and should point out the important points of the article (what is planned to be done, how it is done and the objective) in order to draw attention at the international level.

Introduction

Introduction should be kept short within the limits of the possible and should contain information about the subject. After providing a short review of the literature related with the subject, in the end paragraph, the aim of the study should be mentioned. This part should not exceed 2 pages.

Material and Method

The methods used (including the statistical analysis methods) during the study should be described in an open manner so that the study may be repeated by other researchers, yet, the standard methods should be shown by giving reference without providing comprehensive explanations. Material and Method should be written in an essential and accessible manner without getting into details.

Under the section of Materials and Methods and Findings, subtopics should be mentioned first in bold and after in italic type. Bold sub-topic should be on left side, and the italic sub-topic should take place at the beginning of the paragraph. Table and figure names should be written in Turkish and English.

Findings

Under the section of findings, data should be shortly explained. The data that exist on the table should not be repeated within the text.

The data should be presented in a manner so as to highlight the objective of the study. (Under this section, literature information should not be provided).

Under this section, if the language of the figures and tables is more comprehensible than the language of the text, data should be presented through tables and figures. The headings of tables and figures should be written in Turkish and English.

The length of the tables and figures that are used in the study should not be more than 16-20 cm and their width should not be less than 8 cm. Tables, figures and graphics should be drawn on a separate sheet, if it is not necessary, they should not be installed within the text. During the publication, the note of "Table 1, (Figure 1, Graphic 1) should be here" should be installed with a lining above and beneath within the text in the place where the table, figure or graphics is desired to be seen. Within the text, figure or graphics should certainly be mentioned.

Discussion and Conclusion

This section is section under the scope of which the results of the study are compared with previous studies and where they are commented upon. Data should be discussed under the light of literature knowledge. Under this section, repetitions of the introductory literature review and findings should be avoided. Moreover, the study's contributions to the existing literature should also be explained briefly.

References

The reference list is arranged in alphabetical order. Each reference author's surname should be written in capital letters within the text and the date of the publication should be mentioned. If the reference is more than two authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et all." In the in text usage of reference, if there are more than one reference that refer to the same issue, these should be mentioned according to their date sequence.

The composition of the references and their sequence should be as in the following;

- ◆ The first letter of the names and surnames of the authors should be written in capital letters and in bold.
- ◆ The date of the publication should be mentioned, if the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as a and b.
- ◆ The article's title should be written in *Italic* type.
- ◆ For the abbreviation of journal names, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis.
- ◆ There should be volume and page numbers.

1. Periodicals

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N.caninum in cattle.* J Am Vet Med Ass. 201 (5), 709-713.

2. Author Book

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

3. Edited Book

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

4. Chapter in Edited Book

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

5. Congress Papers

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

6. Thesis

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

- ◆ The articles that are sent to the journal are published in line with their coming date.
- ◆ As the edition of the sent articles are done in accordance with the original text, all responsibility of the articles bear on the authors.
- ◆ The articles that are sent back for changes should reach the edition board within at most 15 days.
- ◆ Unpublished papers are not returned to their author.
- ◆ In case of extra publication requirement, authors pay for the costs.
- ◆ Tables and figure names should be written both in Turkish and in foreign language.
- ◆ Abbreviations, symbols and measurements: Authors should provide the explanation for each scientific explanation where it first appears within the text.
- ◆ The names of species and kinds in Latin should be written in italic. All measures should be given according to the SI (Systeme Internationale).
- ◆ In multiple-author studies, as a correspondence address, only one of the authors' names should be mentioned.
- ◆ The articles that are sent to be published in the journal should be sent with "Publication Rights Transfer Agreement" signed by all of the authors. The selected articles for the publication, and if asked for, the decision of the editorial committee concerning the publication, are declared to the article's author/authors.
- ◆ The wording of "Ethical Commission Permission is obtained" should appear in scientific studies based on animal experiments, which will be published in the Etlik Journal of Veterinary Microbiology.
- ◆ The responsibility of each article that is published in the journal rests on the author.
- ◆ Researches that aim at comparisons of the products with their commercial names are out of the journal's theme scope.
- ◆ The trade marks of the articles and products that are subject of the research should not be mentioned.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi**Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara**

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

Yayının adı:.....

Yazar/ların ad/ları:

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

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

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

Yazışma Adresi:.....

Copyright Release**The Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY**

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

Title of paper:

By authors names:

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

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

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

To be signed by all author/s

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

Correspondence Address:.....