

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 19 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2008

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 19 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2008
The Journal of Etlık Veterinary Microbiology
Yılda bir yayımlanır / Published yearly
ISSN 1016-3573

Enstitü Adına Sahibi

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

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editor-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. Ahmet DOĞANAY
Prof.Dr. Ayhan FİLAZİ
Prof.Dr. Müjgan İZGÜR
Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Prof.Dr. Ender YARSAN

Adres / Address

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
06020 Etlık – 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

Yayınevi, 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)

Araştırmalar

Kültürü yapılan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bakteriyel Böbrek Hastalığı (BKD)'nin teşhisi

*The diagnosis of Bacterial Kidney Disease (BKD) from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*

Sibel ÖZKÖK, Selahattin ŞEN, Hikmet ÜN1-8

Şanlıurfa Balıklıgöl Sazanlarında *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* Olgusu

Dactylogyrus sp. and Trichodina sp. cases in carps of Sanliurfa Balikligol

F.Çiğdem PİŞKİN, Armağan Erdem ÜTÜK.....9-12

Türkiye'de tavuk yumurtalarında organik klorlu pestisid ve poliklorlu bifenil bileşik kalıntı düzeylerinin araştırılması

The Investigation of organochlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls residue levels in eggs of hens in Turkey

Yasemin GÜREL, Rauf AKKAYA, Yusuf YİĞİT, Feride KOÇ, Yavuz Kürşad DAŞ, Ayşin BAŞSATAN YORULMAZ, İlknur KAHVECİ13-18

Evcil ve yabani kanatlardan izole edilen Newcastle Hastalığı viruslarının patotiplendirilmesi

Pathotyping of the Newcastle Disease virus strains isolated from the domestic and wild birds

Asiye DAKMAN, Metin GÜLEÇ, Elçin GÜNAYDIN, Mustafa COŞAR19-26

Genetic analysis of highly pathogenic Avian Influenza A (HPAI) H5N1 viruses isolated from Turkey between 2005 and 2008

Türkiye'de 2005-2008 yılları arasında izole edilen kuş gribi viruslarının genetik analizi

Hikmet ÜN27-38

Kırıkkale'de endüstri bölgesi civarında toprak, yem, su ve bu yörede yetiştirilen koyunlar ile parazitlerinde bazı ağır metallerin (Cd, Cu, Pb, Zn) belirlenmesi

Determination of some heavy metals (Cd, Cu, Pb, Zn) in breeding sheep tissues with parasitisms, soil, water and feedstuffs of around environment industry in Kırıkkale

Atilla BEŞKAYA, Kader YILDIZ, Mehmet BAŞALAN, M. Faruk US.....39-46

Dichlorvos'un ratların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve E'nin koruyucu rolü

Effects of dichlorvos in small intestine tissue of rats and protective role of vitamins C and E

Ayşenur ÇETİN, Yavuz ULUSOY, Ayşe ÖĞÜTCÜ, Fatma Gökçe UZUN, Filiz DEMİR.....47-52

Derlemeler

Arbovirus enfeksiyonları

Arboviral infections

Elvin ÇALIŞKAN, Burak GÜNGÖR53-62

Kanathı *Salmonella* aşılarna farklı perspektiften bakış

View at Poultry Salmonella Vaccines with Different Perspective

Elçin GÜNAYDIN.....63-68

***Staphylococcus aureus* Ekzotoksinleri**

Exotoxins of Staphylococcus aureus

Hamit Kaan MÜŞTAK, Ömer M. ESENDAL69-74

Kültürü yapılan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bakteriyel Böbrek Hastalığı (BKD)'nin teşhisi

Dr. Sibel ÖZKÖK¹, Selahattin ŞEN¹, Hikmet ÜN²

¹Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Su Ürünleri Hastalıkları Araştırma ve Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

²Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Özet: Bu projede *Renibacterium salmoninarum* izolasyon ve identifikasyonu için, 2005-2007 yılları arasında, Kesikköprü Baraj Göleti'nde yer alan 5 adet alabalık işletmesinden toplam 360 adet; Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinden 120 adet 6-12 aylık alabalıklardan böbrek örnekleri aseptik koşullarda alındı. Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinde 120 adet olgun dişi balıklardan ovaryum sıvısı uygun koşullarda alındı. Toplanan örneklerden izolasyon için KDM-2 medium kullanıldı. Toplam 600 adet örnekten hiç *R.salmoninarum* izolasyonu olmadı. Aynı örneklerden DFAT ve nested-PCR testleri yapıldı. Örneklerin hiçbirinde etkene rastlanılmadı.

Sonuç olarak Ankara ve Safranbolu'da Bakteriyel Böbrek Hastalığı saptanamamıştır. Laboratuvarımızda alabalıklarda konvansiyonel izolasyon ve identifikasyon yanında DFAT ve nested-PCR gibi testlerle Bakteriyel Böbrek Hastalığı kısa sürede teşhis edilebilir hale gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel Böbrek Hastalığı, DFAT, Gökkuşığı alabalığı, Nested-PCR, *Renibacterium salmoninarum*.

The diagnosis of Bacterial Kidney Disease (BKD) from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Summary: In this project, totally 360 samples from 5 rainbow trout farms on Kesikköprü barrage lake and aseptically 120 kidney tissues about 6-12 months rainbow trout from one rainbow trout farm from 2005 to 2007 were collected for isolation and identification of *R.salmoninarum*. Ovarian (coelemic) fluids were collected from 120 mature females of fish farming on Safranbolu. KDM-2 medium was used for isolation from samples. *R.salmoninarum* was not isolated on totally 600 samples. DFAT and nested-PCR results of all samples were negative.

As a result Bacterial Kindey Disease was not detected in Ankara and Safranbolu. In our laboratories, Bacterial Kindey Disease could be diagnosed rapidly by conventional isolation and identification with DFAT and nested-PCR on rainbow trout.

Key words: Bacterial Kidney Disease, DFAT, Nested-PCR, Rainbow trout, *Renibacterium salmoninarum*.

Giriş

Ülkemizde balık yetiştiriciliğine 1960'ların sonunda tatlı su balıklarında, deniz balıklarında ise 1986 yılında başlanmıştır. Halen ülkemizde 2001 yılı itibarıyla 1769 adet onaylı balık çiftliği bulunmakta ve bunların 1423'ü iç sularda, 346'sı denizlerimizde faaliyet göstermektedir. Bu çiftliklerin yanı sıra çiftliklerin yavru ihtiyacını temin için 20 adet kuluçkahane bulunmaktadır. Tatlı sularımızda gökkuşığı alabalığı üretimi oldukça yaygın olarak devam etmektedir. Türkiye'de alabalık üretimi 1990 yılında 3 212 ton iken 1999 yılında 38 570 ton ve 2000 yılında ise 44 533 tona çıkmıştır. Bu rakamlardan da anlaşılacağı üzere ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği giderek hızla artmakta ve buna paralel olarak da olumsuz çevre şartları, kalitesiz yem ve hastalıklardan ileri gelen bir takım problemler de ar-

tış göstermektedir. Hastalıklar balıklarda ölüme neden olmaları, ihracatı olumsuz yönde etkilemeleri, tedavi masrafları, uygun kullanılmayan ilaçların rezidü sorunu yaratmaları, çevre kirliliği oluşturmaları, bakteriyel direnç neden olmaları ve iş ve zaman kaybına yol açmaları nedeniyle ülke ekonomisine büyük zararlar vermektedir.

Balık yetiştiricilerimizin büyük çoğunluğu ihtiyaç duydukları yavru balıkları ya kendi kuluçkahanelerinde yetiştirmekte ya da mevcut olan kuluçkahanelerden temin etmektedirler. Kuluçkahanelerde var olan enfeksiyonlar birçok balık işletmesinden taşınmakta ve oradan doğal kaynaklara yayılma ihtimali de her zaman mevcut olmaktadır.

OIE standartlarına ve AB'nin 91/67/EEC ve 93/53/EEC sayılı direktifleri çerçevesinde hastalıklı ve hastalıktan arı zonların, işletmelerin ve kuluçka-

hanelerin belirlenmesi, haritalanması, onaylanması, duyurulması, takibi, iyileştirilmesine yönelik tedbirlerin alınması, sertifikalanması, gerek iç piyasaya gerekse ihracata yönelik ürünlerin yetiştirildiği sular ve taşınmasına yönelik tedbirlerin alınması gerekmektedir. Kuluçkahane ve işletmelerin periyodik aralıklarla kontrollerinin yapılması ve bu kontroller sonucunda hastalık riski taşıyan kuluçkahanelerin gözlem altına alınması sağlanmalıdır.

Bakteriyel Böbrek Hastalığı (BKD) salmonidlerde yüksek mortalite ile seyreden sistemik bir enfeksiyondur. Hastalık genellikle kronik olarak seyrederek, ancak özellikle düşük ısılarında (13-18°C) akut hale geçip salgınlar halinde görülebilir. Salgınlar ilk defa İskoçya'da Atlantik salmonlarda bildirilmiştir. Daha sonra ABD'de 1935 yılında hastalık bildiri yapılmıştır (BULLOCK ve HERMAN, 1980).

Etken küçük, hareketsiz, gram pozitif, diplokoklardır. İlk defa Ordal ve Earp (1956), izole etmeyi başarmışlar ve *Corynebacterium* olarak klasifiye etmişlerdir. Sanders ve Fryer (1980), etkenin biyokimyasal özelliklerini dikkate olarak *Renibacterium salmoninarum* olarak isimlendirmişlerdir (BULLOCK ve HERMAN, 1980). Bullock ve Stuckey (1975), oldukça hızlı olan direkt ve indirek FAT ile subklinik ve klinik enfekte hayvanları saptayabilmişlerdir (BULLOCK ve HERMAN, 1980).

R.salmoninarum'un 1990 ve 2002 yılları arasında yapılan izleme programında İskoçya sularında Atlantik salmon ve gökkuşağı alabalıklarında birçok salgınlar yaptığı tespit edilmiştir. Teşhis için kültür, bakteriyoskopi ve ELISA kullanılmıştır (BRUNO, 2004).

Bakteri yabancı stoklardan yumurta yolu ile hatcherilere taşınmaktadır. Rutin olarak balık ürünleri pastörizasyona tabi olduğu halde stoklardan BKD elemine edilememiştir. Hayli yüksek patojen olan bu etkenin kontrolü için hızlı ve duyarlı test metotları kullanılması oldukça avantaj sağlamaktadır. Bunlara rağmen BKD halen doğal ve kültür alabalıklılığında ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (FRYER ve LANNAN, 1993).

Bakteriyel Böbrek Hastalığı ilk olarak 1930 yılında İngiltere'de Atlantik Salmonlarda tanımlanmış. 1935 yılında ABD'de alabalık yavrularında ortaya çıkmıştır. Ancak etken izolasyonu 1950'li yıllarda yapılmıştır. 1995 yılında ABD'de yapılan bir

çalışmada yavru alabalıklarda tespit edilen Bakteriyel Böbrek Hastalığı için kullanılan teşhis yöntemleri karşılaştırılmıştır. Yine 1995 yılında Finlandiya'da balıklarda BKD üzerinde çalışılmıştır. Kanada'da 1995 yılında Atlantic salmon ve *Salmo salar* kuluçkahanelerindeki yavru balıklarda *R.salmoninarum* IFAT testi ile araştırılmış, 424 adet balığın % 13.7'sinde hastalık tespit edilmiştir. 1992 yılında İspanya'da ilk *R.salmoninarum* izolasyonu bildirilmiştir. 1994 yılında ise Polonya'da, 1993 yılında İngiltere'de alabalıklarda bu hastalık araştırılmıştır. 1987 yılında Norveç'te yapılan bir çalışmada 11 işletmede BKD tespit edilmiştir.

Chase ve Pascho (1998), yaptıkları bir çalışmada Salmonid'lerin vücut sıvılarından ve dokularında nükleik asid bazlı testlerle *R.salmoninarum* teşhis etmişlerdir. Nested-PCR yöntemini kullanmışlar, böbreklerden konvansiyonel PCR yönteminden daha çok etken saptamışlardır. Nested-PCR'in yanlış pozitif reaksiyonlar veren ELISA ve FAT tekniklerinden daha hassas olduğunu saptamışlardır. 74 adet doğal enfekte chinook salmondada yaptıkları çalışmada Nested-PCR, ELISA ve FAT oranlarını %61, 47 ve 43 olarak bulmuşlardır.

Pascho ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada doğal enfekte 103 adet chinook salmon ovaryum sıvıları üzerinde çalışmışlar; ELISA ile % 39'unu , nested-PCR ile de hasta olanların % 100'ünü saptamışlardır.

Miriam ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışma sonucunda enfekte ovaryum sıvısında çok düşük orandaki *R.salmoninarum*'un da saptanabildiğini ve kültürü yapılamayan veya ölen bakterilerin saptanmasında bu yöntemin güvenle kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

White ve ark. (1995), çalışmalarında kültür, ELISA ve FAT karşılaştırmışlar; yüksek dozla enfekte dokularda ELISA ve FAT daha hassas olduğu halde düşük dozla enfekte dokularda bakteriyolojik kültürden daha düşük hassasiyette olduğunu saptamışlardır.

Magnusson ve ark. (1994), yaptıkları bir diğer çalışmada doğal enfekte balıklardan alınan özellikle ovaryum sıvılarında reverse transcription ve nested-PCR bazlı yöntemlerde 1-10 bakteriye kadar etkenin saptanabildiğini ve 1-2 gün içinde sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir.

Jansson (2002), Sueciae’de yaptığı tez çalışmasında 400 adet salmonid balık böbrekleri üzerine ELISA ve kültür yöntemlerini kullanarak *R.salmoninarum* tespit etmeye çalışmış, ancak BKD yönünden hepsini negatif bulmuştur.

Türkiye’de ilk olarak 1977 yılında G. Halıcı, E. İstanbulluoğlu ve M. Arda tarafından Bayındır Barajı alabalık yetiştirme istasyonunda görülen bakteriyel böbrek hastalığı ve sağaltımı üzerinde çalışılmıştır.

M. Sarıeyyüpoğlu, A. Muz ve Y. Özdemir tarafından 1985 yılında yapılan bir çalışmada Ovacık-Tunceli alabalık yetiştirme istasyonunda 10 adet alabalıkta *R.salmoninarum* tespit edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında 3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu’nun 4. maddesine göre İhbarı Mecburi Hastalıklar Hakkındaki No: 2007/132 ve 08.05.2007 tarih ve 26580 sayılı Resmi Gazete’de İhbarı Mecburi Hastalıklar grubunda yer alan Bacterial Kidney Disease (Bakteriyel Böbrek Hastalığı, BKD) üzerine bir çalışma yapılması ve bu doğrultuda hastalığın alabalık işletmeleri ve kuluçkahanelerinde yaygınlığı amaçlanmıştır. Bu çalışmada *R.salmoninarum*’un kültürü yapılan alabalıklardan izolasyon ve identifikasyonu, DFAT ve PCR testleri ile tespiti ve antibiyogramı amaçlanmıştır. *R.salmoninarum* ile ilgili olarak daha evvel Türkiye’de DFAT ve PCR testleri ile yapılan bir çalışma

Tablo 1. Alabalık işletmelerinden alınan numune sayısı.

Kesikköprü Baraj Göleti’nde Yer Alan İşletmelerden Alınan Numune Sayısı					
	1.yıl		2.yıl		Toplam
	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem	
1. İşletme (böbrek)	30	30	30	30	120
2. İşletme (böbrek)	30	30	30	-	90
3. İşletme (böbrek)	30	30	-	-	60
4. İşletme (böbrek)	30	30	-	-	60
5. İşletme (böbrek)	30	-	-	-	30
Safranboluda Yer Alan İşletmeler					
1. İşletme (böbrek)	30	30	30	30	120
Damızlık (Ovaryum sıvısı)	30	30	30	30	120
Toplam	210	180	120	90	600

Besi yeri: İzolasyon için OIE’nin öngördüğü besi yerlerinden % 5-10 fetal sığır serumu bulunan KDM-2 medium kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

bulunmamaktadır. Bu araştırmada OIE’nin önerdiği *R.salmoninarum*’un konvansiyonel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu ile birlikte hızlı ve etkili teşhis yöntemleri olan DFAT ve nested-PCR testleri de kullanılmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklerin Toplanması: Bu proje planlanırken her bir işletmeden 2 yıl süresince 2 kez 30’ar adet numune toplanılmasına karar verildi. Ancak global su sorunu nedeni ile Büyük Kızılırmak Projesinden dolayı Kesikköprü Baraj Göleti’nden Ankara’ya su temin edilmesi çalışmaları sonucu alabalık işletmelerinin bir kısmı kapandı, bir kısmı da üretimi durdurdu. Bu nedenle hedeflenen sayıya ulaşılamadı. Ancak Kesikköprüde kapanan işletmelere ilaveten Safranbolu’dan bir adet alabalık işletmesi ve bir adet de damızlık işletmesi projeye dahil edildi. Aşağı verilen tabloda hangi işletmelerden ne kadar numune toplandığı belirtilmiştir (Tablo 1). Bu Projede *R.salmoninarum* izolasyon ve identifikasyonu için, Kesikköprü Baraj Göleti’nde yer alan 5 adet alabalık işletmesinden toplam 360 adet; Safranbolu’da yer alan 1 adet alabalık işletmesinden 120 adet 6-12 aylık alabalıklardan böbrek örnekleri aseptik koşullarda alındı. Safranbolu’da yer alan 1 adet alabalık işletmesinde 120 adet olgun dişi balıklardan ovaryum sıvısı uygun koşullarda alındı.

Strip: İdentifikasyonu için OIE’nin önerdiği API-Zym kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

Konjugate: İşaretli antikör olarak “fluorescein labeled affinity purified antibody to

R.salmoninarum, Maryland, 20879 USA” kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

Primerler: İlk etapta 75-93 (5'-AGC-TTC-GCA-TGA-G-3';P3) ve reverse 438-458 (5'-GCA-ACA-GGT-TTA-TTT-GCC-GGG-3;M21) primerleri,

- İkincisinde 95-119 (5'-ATT-CTT-CCA-CTT-CAA-CAG-TAC-AAG-G-3';P4) ve reverse 394-415 (5'-CAT-TAT-CGT-TAC-ACC-CGA-AAC-C-3'; M38) primerleri kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

İzolasyon: İzolasyon için OIE'nin öngördüğü besi yerlerinden % 5-10 fetal sığır serumu bulunan KDM-2 medium kullanıldı. Ortalama 3 hafta (8-16 hafta) 15°C'de inkübe edildi. *R.salmoninarum* küçük, (0.3-1.5 x 0.1-1 µm) Gram pozitif, PAS pozitif, hareketsiz, sıklıkla çift, kısa çomak veya pleomorfik, “Çin yazısına” benzer formdadır. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftir (OIE. Manual, 2006).

İdentifikasyon: İzole edilen bakteriler oksidaz ve katalaz testlerine tabii tutulur. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif olan identifikasyonu için OIE'nin önerdiği API-Zym kullanıldı (OIE. Manual, 2006; AUSTİN ve AUSTİN, 1999). *R.salmoninarum*'un API Zym'deki profili şu şekildedir.: -+--+--+--+--+--+--+ (AUSTİN ve AUSTİN, 1999).

DFAT: Enfekte dokularda *R.salmoninarum*'un tespiti için direkt immunofluoresans testi (DFAT) kullanıldı. DFAT testi *R.salmoninarum*'un tespitinde kullanılan oldukça yaygın bir testtir. Bu testte 3 bölüm yer almaktadır. Böbrek ve ovaryum sıvıları lama fikze edildi, işaretli antikorla boyandı, değerlendirildi. DFAT testi sonuçları OIE Manual 2006'da belirtilen standart kriterler baz alınarak yapıldı.

a) Böbrek örnekleri ve ovaryum sıvıları: Böbrek dokularından ve ovaryum sıvılarından frotiler hazırlandı, kurutuldu ve metanol ile yaklaşık 5-10 dakika tespit edildi.

b) Pozitif ve negatif kontrol: DFAT'inde pozitif kontrol olarak *R.salmoninarum* (ATCC 33209) suşu kullanıldı.

c) Preparatlar karanlık ve nemli ortamda muhafaza edildi. Her preparata bir damla (100µL) spesifik FITC-konjugate ilave edildi.

d) Oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.

e) Preparatlar PBS (pH=7.1) ile yıkandı.

f) Havada kurutulup ve bir damla mounting medium ilave edilip, lamel ile kapatıldı.

g) Okuma ve yorum: Preparatlar floresan mikraskopta x1000 büyütmede okundu. Önce pozitif ve negatif kontrole bakıldı (OIE. Manual, 2006).

PCR testi: Doku örneklerinden ve ovaryum sıvılarından nested-PCR yapıldı. Nested-PCR'da Chase D.M. ve Pascho R.J. (1998), Pascho R.J., Chase D. ve McKibben C.L. (1998)'de belirtilen metod baz alındı (OIE. Manual, 2006).

a) Primer dizaynı: Bu metoda göre testte iki adet oligonükleotid primer kullanıldı. Primerler *R.salmoninarum*'un p57 protein sekansına göre dizayn ettirilmiştir.

- İlk aşama PCR'da forward 75-93 (5'-AGC-TTC-GCA-TGA-G-3';P3) ve reverse 438-458 (5'-GCA-ACA-GGT-TTA-TTT-GCC-GGG-3;M21) primerleri kullanıldı.

- İkinci aşama PCR'da (nested) forward 95-119 (5'-ATT-CTT-CCA-CTT-CAA-CAG-TAC-AAG-G-3';P4) ve reverse 394-415 (5'-CAT-TAT-CGT-TAC-ACC-CGA-AAC-C-3'; M38) primerleri kullanıldı.

b) DNA ekstraksiyonu ve purifikasyonu için DNA ekstraksiyon Kit'i kullanıldı (DNeasy Tissue Kit, Qiagen). Elde edilen DNA'lar spektrofotometrede ölçüldü (Nanodrop, ND-1000).

- Böbrek Dokusu: Böbreklerden yaklaşık 25-50 mg doku örnekleri 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.

- Ovaryum sıvıları: 25 ml ovaryum sıvısı 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı.

- *R.salmoninarum*:

c) Nükleik asit örneklerinin saflık kontrolü: DNA örnekleri 260 ve 280 nm absorbance hacimde, moleküler biyolojik kalite su konsantrasyonu 0.01 ve 0.1 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Saf DNA oranı A260/A280'de 1.8-2.0 oranında olmasına dikkat edildi.

d) Birinci basamak PCR protokolü:

PCR reaksiyon miksinin hazırlanması:

- Toplam hacim 50 µl olmalı: 10 µl nükleik asit ve 40 µl reaksiyon miksi olmalı. Reaksiyon miksi içerisinde 0.2 mM her bir nükleotid, 50 mM KCL, 10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir primer (P3 ve M21) ve Taq polymerase.

- Template DNA hariç tüm reagentlar “Master Mix” tüpüne yerleştirilir.

- PCR tüplerine 10 µl DNA ekstraksiyonları ilave edilir.

- PCR tüpleri termal cyclera yerleştirilir.

- Termal cyclus programı şu şekilde olur: 30 kez denaturasyon 94°C 30 saniye; annealing 60°C 30 saniye; extending 72°C 1 dakika.

e) İkinci basamak PCR protokolü:

Toplam hacim 50 µl olmalı: 1 µl ilk basamakta elde edilen amplifiye DNA ve 49 µl reaksiyon mixi olmalı. Master mix içerisinde 0.2 mM her bir nükleotid, 50 mM KCL, 10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir primer (P4 ve M38) ve Taq polymerase.

- Amplifiye DNA hariç tüm reagentlar “Master Mix” tüpüne yerleştirilir.

- PCR tüplerine 1 µl ilk basamak PCR ürünü ilave edilir.

- PCR tüpleri termal cyclera yerleştirilir.

- Termal cyclus programı şu şekilde olur: 30 kez denaturasyon 94°C 30 saniye; annealing 60°C 30 saniye; extending 72°C 1 dakika.

f) Amplifiye DNA'nın görünür hale getirilmesi:

- Yaklaşık 10 µl PCR ürünü jel elektroforezde (% 2 agaroz jel) yürütülür. Her elektroforezde 1 kb DNA ladder (marker)'da olmalıdır.

- Jel boyanması için 5 mg/ml ethidium bromide kullanılır.

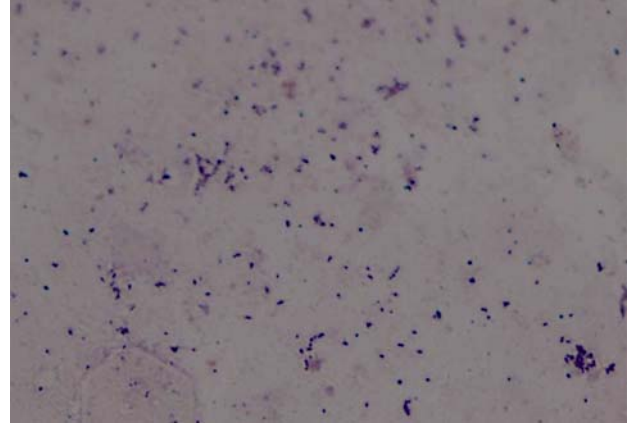
- Jel UV transillumination altında değerlendirilir. *R.salmoninarum* 320 baz çifti olarak tespit edilir (OIE. Manual, 2006).

Antibiyogram: İzole edilen suşların antibiyogram duyarlılık testi ATB-Vet ile yapıldı (OIE. Manual, 2006).

Bulgular

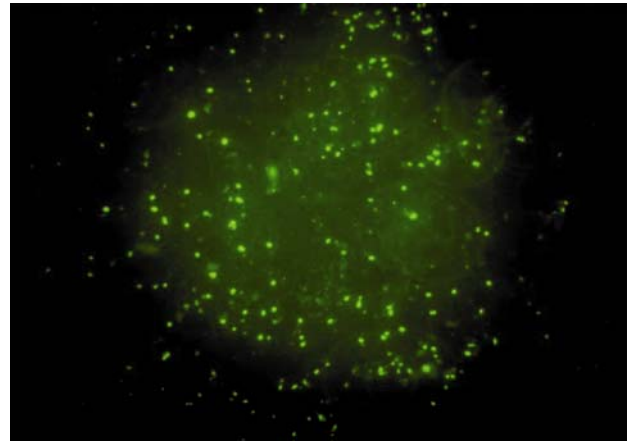
Bu projede *R.salmoninarum* izolasyon ve identifikasyonu için, Kesikköprü Baraj Göleti'nde yer alan 5 adet alabalık işletmesinden toplam 360 adet; Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinden 120 adet 6-12 aylık alabalıklardan böbrek örnekleri aseptik koşullarda alındı. Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinde 120 adet olgun dişi balıklardan ovaryum sıvısı uygun koşullarda alındı. Toplam 600 adet numune toplandı.

Toplanan örneklerden *R.salmoninarum* izolasyonu için KDM-2 medium kullanıldı. Toplam 600 adet numuneden KDM-2 mediuma aseptik koşullarda ekimler yapıldı ve 15°C'de 4-6 hafta inkübe edildi. Kontrol için standart *R.salmoninarum*'da aynı koşullarda inkübe edildi. Toplam 600 adet böbrek ve ovaryum sıvılarından yapılan hiçbir ekimde *R.salmoninarum* izolasyonu olmadı. *R.salmoninarum* standart suşu ise 48 saat sonra üremeye başladı. API Zym ile yapılan identifikasyonda OIE. Manual 2006'da belirtilen profilin aynısı saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. *R.salmoninarum* küçük, (0.3-1.5 x 0.1-1 µm) Gram pozitif, sıklıkla çift, kısa çomak veya pleomorfik, “Çin yazısına” benzer formda mikroskopik görüntüsü.

Bu projede toplanan 600 adet numune işaretli antikorla (fluorescein labeled Affinity purified antibody to *Renibacterium salmoninarum*, Maryland, 20879 USA) DFAT yapıldı. Numunelerin hiçbirinde etkene rastlanılmadı. Pozitif kontrolde ise oldukça kuvvetli fluoresans veren *R.salmoninarum* oldukça yoğun görüldü (Şekil 2).



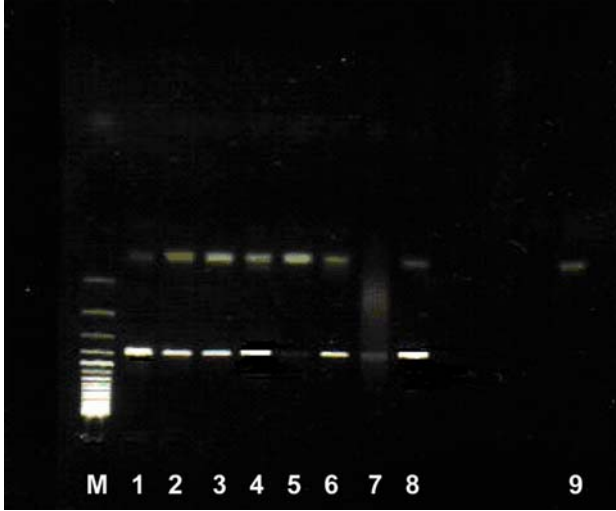
Şekil 2. *R.salmoninarum* standart suşun DFAT ile boyanmış, fluoresans mikroskoptaki görüntüsü.

Nükleik asit örneklerinin saflık kontrolü: DNA örnekleri 260 ve 280 nm absorbance hacimde, moleküler biyolojik kalite su konsantrasyonu 0.01 ve 0.1 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen DNA'lar spektrofotometrede ölçüldü (Nanodrop, ND-1000). Saf DNA oranı A260/A280'de 1.9 oranında bulundu.

Böbreklerden ve ovaryum sıvılarından nested-PCR yapıldı. Nested PCR'da Chase D.M. ve Pascho R.J. (1998), Pascho R.J., Chase D. ve McKibben C.L. (1998)'de belirtilen metod baz alındı (OIE. Manual, 2006). DNA ekstraksiyonu ve purifikasyonu için DNA ekstraksiyon Kit'i kullanıldı (DNeasy Tissue Kit, Qiagen) (OIE. Manual, 2006).

PCR ürünlerinin 10 µl'si % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlendi.

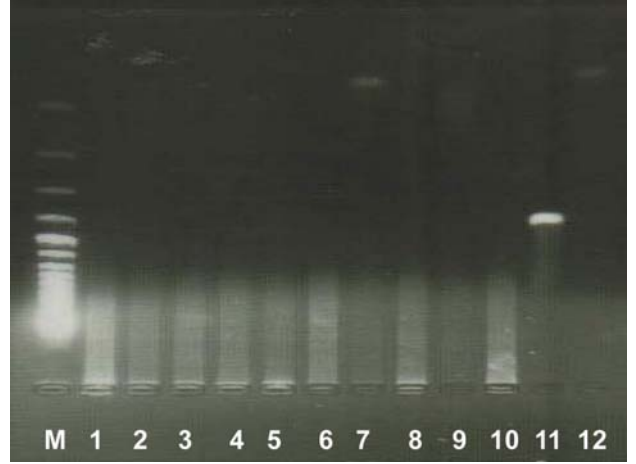
PCR testinin sensitivite ölçümü için içerisinde 1.5×10^2 bakteri/ml bulunan pozitif kontrolün -1'den -7'ye kadar 10 katlı dilusyonları hazırlandı ve hepsi ayrı ayrı PCR işlemine tabii tutuldu. Son dilüsyon basamağında (-7) dahi pozitifliğin saptandığı tespit edildi. Testin sonucunda 150 bakteri/ml'den 15 bakteri/µl'ye kadar etken PCR ile saptanabilmiştir (Şekil 3).



M:Marker, 1:10⁻¹, 2:10⁻², 3:10⁻³, 4:10⁻⁴, 5:10⁻⁵, 6:10⁻⁶, 7:10⁻⁷ (15 bakteri/µl), 8: Saf pozitif kontrol (0.5 Mac Farland: 1.5x10² bakteri/ml), 9: Negatif kontrol

Şekil 3. PCR testinin sensitivitesini ölçmek için yapılan Pozitif kültür ve 10 katlı dilusyonların PCR sonuçları.

Toplam 600 adet numune nested-PCR'a tabii tutuldu. Örneklerin hiçbirinde 320 baz çifti saptanmadı (Şekil 4).



M:Marker, 10 adet alabank böbrek örneği, 11: Pozitif kontrol, 12: Negatif kontrol.

Şekil 4. Nested-PCR yapılan bazı numunelerin ve pozitif kontrolün oluşturduğu bantlar.

Bu projede Ankara ve Safranbolu'dan toplanan toplam 480 adet böbrek ve 120 adet ovaryum sıvısında konvansiyonel izolasyon, DFAT ve nested-PCR testleri ile *R.salmoninarum* tespit edilememiştir. Bu bölgede Bakteriyel Böbrek Hastalığı'nın olmadığı görülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Bu etkenin teşhisi için DFAT ve Nested-PCR konvansiyonel izolasyon ve identifikasyona göre daha uygun testlerdir. Konvansiyonel izolasyon yönteminde inkübasyon süresi çok uzundur; bu uzun inkübasyon süresi boyunca kontaminasyon riski oldukça artmaktadır. Ayrıca *R.salmoninarum* besi yerinde diğer bilindik bakterilerden farklı tarzda üremektedir. DFAT ve PCR testi oldukça kısa sürede sonuç verebilmekte ve konvansiyonel yöntem göre daha güvenilirdir.

Magnusson ve ark. (1994), yaptıkları bir diğer çalışmada, doğal enfekte balıklardan alınan özellikle ovaryum sıvılarında reverse transcription ve nested-PCR bazı yöntemlerde 1-10 bakteriye kadar etkenin saptanabildiğini ve 1-2 gün içinde sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir. Bu projede PCR testinin spesivitesini ölçmek için yapılan diluslardan elde edilen PCR sonucunda 15 bakteri/µl'de saptayabildiği görülmüştür. Bu da oldukça düşük bir orandır. Nested-PCR, *R.salmoninarum*'un tespitinde oldukça duyarlı bir metottur.

White ve ark. (1995), çalışmalarında kültür, ELISA ve FAT karşılaştırmışlar. Yüksek dozla enfekte dokularda ELISA ve FAT daha hassas ol-

duğu halde düşük dozla enfekte dokularda bakteriyolojik kültürden daha düşük hassasiyette olduğunu saptamışlardır.

Miriam ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışma sonucunda enfekte ovaryum sıvısında çok düşük orandaki *R.salmoninarum*'un da saptanabildiğini ve kültürü yapılamayan veya ölen bakterilerin saptanmasında bu yöntemin güvenle kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Chase ve Pascho (1998), yaptıkları bir çalışmada Salmonid'lerin vücut sıvılarından ve dokularında nükleik asid bazlı testlerle *R.salmoninarum* teşhis etmişlerdir. Nested-PCR yöntemini kullanmışlar, böbreklerden konvansiyonel PCR yönteminden daha çok etken saptamışlardır. Nested-PCR'in yanlış pozitif reaksiyonlar veren ELISA ve FAT tekniklerinden daha hassas olduğunu saptamışlardır. 74 adet doğal enfekte chinook salmonda yaptıkları çalışmada nested-PCR, ELISA ve FAT oranlarını % 61, 47 ve 43 olarak bulmuşlardır. Bu projede herhangi bir izolasyon olmadığı için testler arasında bir karşılaştırılma yapılamamıştır.

Pascho ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada doğal enfekte 103 adet chinook salmon ovaryum sıvıları üzerinde çalışmışlar; ELISA ile % 39'unu , nested-PCR ile de hasta olanların % 100'ünü saptamışlardır.

Jansson (2002), Sueciae'de yaptığı tez çalışmasında 400 adet salmonid balık böbrekleri üzerine ELISA ve kültür yöntemlerini kullanarak *R.salmoninarum* tespit etmeye çalışmış, ancak BKD yönünden hepsini negatif bulmuştur.

Sonuç olarak bu projede Ankara ve Safranbolu'da Bakteriyel Böbrek Hastalığı saptanamamıştır. Vertikal ve horizontal bulaşan *R.salmoninarum*'un neden olduğu bu hastalığın teşhisi yönünden laboratuvarımız alt yapısı uygun hale getirilmiş; konvansiyonel izolasyon ve identifikasyon yanında DFAT ve nested-PCR gibi testlerle alabalıklarda Bakteriyel Böbrek Hastalığı kısa sürede teşhis edilebilir hale gelmiştir. İhbari mecburi hastalıklar arasında yer alan bu hastalık yönünden alabalık işletmelerinin 6 ay aralıklarla yılda iki kez taramaları yapılması gerekmektedir. Bu proje ileride yapılabilecek çalışmalara da bu anlamda ışık tutmaktadır.

Kaynaklar

1. **Austin B, Austin DA**, eds., (1999). *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, Third Edition. Springer-Praxis, Chichester, UK.
2. **Bruno DW**, (2004). *Prevalance and diagnosis of bacterial kidney disease (BKD) in Scotland between 1990 and 2002*. Dis Aquat Organ. 59 (2), 125-30.
3. **Bullock GL, Herman RL**, (1980). *Bacterial Kidney Disease of Salmonid fishes caused by Renibacterium salmoninarum*. Fish Disease Leaflet 78, U.S. Fish and Wildlife Service, National Fisheries Research Center-Leetown, National Fish Research Laboratory, Box 700, Kearneysville, West Virginia.
4. **Bullock GL, Stuckey HM**, (1975). *Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease in salmonids*. J Fisheries Res Board Can. 32. 2224-2227.
5. **Chase DM, Pascho RJ**, (1998). *Development of a nested polymerase chain reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of Renibacterium salmoninarum that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in Salmonid kidney*. Dis Aquat Org. 34. 223-229.
6. **Fryer JL, Lannan CN**, (1993). *The history and current status of Renibacterium salmoninarum causitive agent of bacterial kidney disease in Pacific salmon*. Fisheries Resarch. 17, 15-33.
7. **Hahcı G, İstanbulluoğlu E, Arda M**, (1977). *Bayındır Barajı alabalık yetiştirme istasyonunda görülen bakteriyel böbrek hastalığı ve sağaltımı*. İstanbul Üni Vet Fak Derg 3 (1-2), 22-27.
8. **Jonsson E**, (2002). *Bacterial Kidney Disease in salmonid fish*. PhD Thesis, Acta Universitatis agriculturae Sueciae Veterinaria, vol. 116.
9. **Magnusson HB, Fridjonsson OH, Andresson OS, Benediksdottir E, Gudmundsdottir S, Anderstottir V**, (1994). *Renibacterium salmoninarum, the causitive agent of bacterial kidney disease in salmonid fish, detected by nested reverse transcription-PCR of 16S rRNA sequences*. Appl Environ Microbiol. 60 (12), 4580-4583.
10. **Manual of Diagnostik Tests for Aquatic animals 2006, (OIE)** Bacterial Kidney Disease (*Renibacterium salmoninarum*) Part 2. Section 2.1, Chapter 2.1.11 p:1-19
11. **Miriam A, Griffiths SG, Lovely JE, Lynch WH**, (1997). *PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic salmon (Salmo salar L.) ovarian fluid and kidney tissue for presence of DNA of the fish pathogen Renibacterium salmoninarum*. J Clin Microbiol. 35(6). 1322-1326.
12. **Ordal EJ, Earp BJ**, (1956). *Cultivation and transmission of etiological agent of kidney disease in salmonid fishes*. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine. 92, 85-88.

13. **Pascho JR, Chase D, McKibben CL**, (1998). *Comparison of the membrane-filtration fluorescent antibody test, the enzyme-linked immunosorbent assay and the polymerase chain reaction to detect Renibacterium salmoninarum in salmonid ovarian fluid*. J Vet Diag Invest. 10, 60-66.
14. **Sarıyüpoğlu M, Muz A, Özdemir Y**, (1985). *Ovacık-Tunceli alabalık yetiştirme istasyonunda oluşan bakteriyel böbrek hastalığı*. Ege Üni Su Ürün Derg. 2 (5-6),71-78.
15. **White MR, Wu CC, Albrechts SR, Wu CC**, (1995). *Comparison of diagnostic tests for bacterial kidney disease in juvenile steelhead trout (Oncorhynchus mykiss)*. J Vet Diag Invest 74, 494-499.

Şanlıurfa Balıklıgöl Sazanlarında *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* Olgusu

F. Çiğdem PİŞKİN¹, Armağan Erdem ÜTÜK¹

¹ Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji ve Arı Hastalıkları Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Özet: Rutin kontrol amacı ile laboratuvarımıza gönderilen dört sazan balığının incelenmesi neticesinde balıkların ikisinde *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Sazan, *Dactylogyrus sp.*, *Trichodina sp.*

***Dactylogyrus sp.* and *Trichodina sp.* cases in carps of Sanliurfa Balikligol**

Summary: Following the parasitological examination of four carps sent to our laboratory for routine control purpose *Dactylogyrus sp.* and *Trichodina sp.* are diagnosed in two of them.

Key words: Carp, *Dactylogyrus sp.*, *Trichodina sp.*

Giriş

Dactylogyrus türleri genellikle balıkların solungaçlarına daha az olarak da derilerine yerleşen monogenik trematodlardır. Az sayıda bulduklarında fazla patojen olmayan bu türler solungaçlara yerleştikleri yoğun enfeksiyonlarda hipoksi, anemi ve ölümlere sebebiyet vermektedirler. Deride ise üslerlere, mukus artışına ve yamalı bir görünüme neden olurlar. Sekonder bakteri ve mantar enfeksiyonlarının şekillenmesi ile tablo daha da ciddileşir. *Trichodina* türleri ise balıkların deri ve solungaçlarına yerleşen protozoonlardır. Ağır enfeksiyonlarda iştahsızlık, zayıflama, solungaç lamellerinde şişme, yapışma, normal görünümün bozulması, solunum gücü ve ölüm görülebilmektedir. Her iki türde deniz balıklarında ve tatlı su balıklarında enfeksiyona neden olabilmektedir (LUCKY ve HOFFMAN, 1977; NOGA, 2000; ÖGE, 1999).

Ülkemizde tatlı su balıkları ve akvaryum balıklarının parazitleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda bulunan çok sayıda tür, Türkiye parazit faunasına büyük katkı sağlamıştır. *Dactylogyrus* türleri akvaryum balıklarında, sazanlarda (*Cyprinus carpio*), kadife balıklarında (*Tinca tinca*), yayın balıklarında (*Silurus glanis*), havuz balıklarında (*Carassius carassius*), karabalıklarda (*Vimba vimba*), kızılkanat balıklarında (*Scardinius erythrophthalmus*), alabalıklarda (*Salmo gairdneri*), gökkuşuğu alabalıklarında (*Salmo trutta*), turna balıklarında (*Esox lucius*), gümüş-inci balıklarında (*Alburnus sp.*) çapak balıklarında (*Abramis brama*),

Alburnus spp.'de, *Varicorhinus sp.*'de, *Barbus sp.*'de ve *Chondrostoma sp.*'de, *Trichodina* türleri ise akvaryum balıklarında, sazanlarda (*Cyprinus carpio*), ot sazanlarında (*Ctenopharyngodon idella*), gümüş-inci balıklarında (*Alburnus sp.*), kadife balıklarında (*Tinca tinca*), alabalıklarda (*Salmo gairdneri*), yayın balıklarında (*Silurus glanis*), turna balıklarında (*Esox lucius*), *Varicorhinus sp.*'de, *Barbus sp.*'de bulunmuştur (AYDOĞDU ve ark., 1997; BURGU ve ark., 1988; CANTORAY ve ÖZCAN, 1975; DOĞANAY ve ark., 1989; EKİNGEN, 1975, 1976; KARATÖY ve SOYLU, 2006; KIR ve ark., 2004; KIR ve ÖZAN, 2007; KOYUNCU ve CENGİZLER, 2002; OĞUZ ve ÖZTÜRK, 1993; OĞUZ ve ark., 1996; ÖGE ve AYDIN, 1995; ÖZAN ve KIR, 2005; ÖZTÜRK, 2005; ÖZTÜRK ve ALTUNEL, 1995; ÖZTÜRK ve ark., 2001; SELVER ve AYDOĞDU, 2006; TÜRKMEN ve TÜZER, 1990; UZBİLİK ve YILDIZ, 2002; UZUNAY ve SOYLU, 2006; YILDIRIM ve ark., 2006).

Bu çalışma ile Şanlıurfa'nın simgesi olan Balıklıgöl'de bulunan sazan balıklarında *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* tespit edilmiştir.

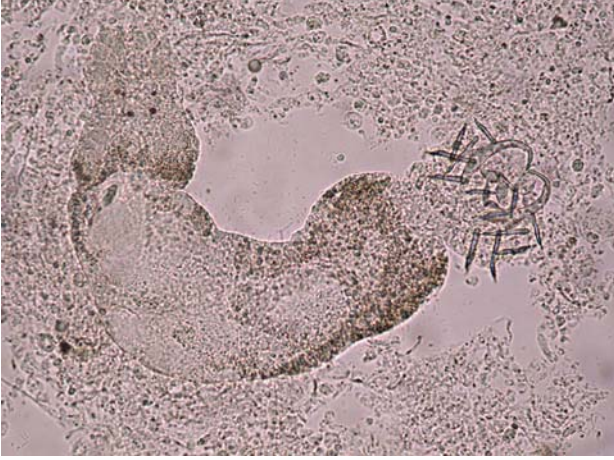
Materyal ve Metot

Rutin kontrol amacı ile laboratuvarımıza gönderilen dört sazan balığı araştırmamızın konusunu oluşturmuştur. Örnekler gelir gelmez incelemeye tabi tutulmuştur. Balıkların deri, yüzgeç, solungaç lamellerinden hazırlanan kazıntı örnekleri ve iç organları incelenmiştir. Bulunan parazitler geçici pre-

parat haline getirilerek cins tayinleri yapılmıştır. Parazitlerin aranması, tespiti, hazırlanması ve teşhisi ilgili kaynaklar ışığında yapılmıştır (LUCKY ve HOFFMAN, 1977; NOGA, 2000). Çalışmada Olympus BX51 mikroskop ve Olymplus Camedia C7070 dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

Bulgular

Laboratuvarımıza rutin kontrol amacı ile gönderilen dört sazan balığının incelenmesi sonucunda balıklardan ikisinde *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* belirlenmiştir.



Şekil 1: *Dactylogyrus sp.*



Şekil 2: *Trichodina sp.*

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde tatlı su balıklarının parazit faunasını belirlemek amacıyla Keban Gölü, Cip Gölü, Munzur Çayı, Adıyaman Gölbaşı Gölü, İznik Gölü, Uluabat (Apolyont) Gölü, Mogan Gölü, Eymir Gölü, Kurtboğazi, Hirfanlı, Sarıyer Baraj Gölleri, Kızılcahamam ve Nallıhan Dereleri, Çankırı ve Günerdiğin Göletleri, Eğirdir Gölü, Manyas Gölü, Karacaören I Baraj Gölü, Eber Gölü, Kovada Gölü, Sapanca Gölü, Durusu (Terkos) Gölü, Kocadere Deresi, Çifteler Sakaryabaşı Balık Üretim ve Araştırma İstasyonu gibi iç sularda yaşayan sazan (*Cyprinus carpio Linnaeus, 1758*), akbalık (*Rutilus frisii*), havuz balığı (*Carassius carassius Linnaeus, 1758*), karabalık (*Vimba vimba*), kaya (*Gobius fluviatilis*), sudak (*Stizostedion lucioperca*), kızılkanat (*Scardinius erythrophthalmus*), çapak (*Abramis brama*), gümüş-inci balığı (*Alburnus sp.*), kadife (*Tinca tinca*), alabalık (*Salmo gairdneri*), yayın (*Silurus glanis*), turna (*Esox lucius*), *Varicorhinus sp.*, *Barbus sp.*, *Chondrostoma sp.*, *Blicca bjoerkna* ve *Aspius aspius* gibi tatlı su balıkları ile akvaryum balıkları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda tespit edilen çok sayıda protozoon, trematod, cestod, nematod, acanthocephala, sülük ve artropodlar ile Türkiye parazit faunası zenginlik kazanmıştır (AYDOĞDU ve ark., 1997; BURGU ve ark., 1988; CANTORAY ve ÖZCAN, 1975; DOĞANAY ve ark., 1989; EKİNGEN, 1975, 1976; KARATOY ve SOYLU, 2006; KIR ve ark., 2004; KIR ve ÖZAN, 2007; KOYUNCU ve CENGİZLER, 2002; OĞUZ ve ÖZTÜRK, 1993; OĞUZ ve ark., 1996; ÖGE ve AYDIN, 1995; ÖZAN ve KIR, 2005; ÖZTÜRK, 2005; ÖZTÜRK ve ALTUNEL, 1995; ÖZTÜRK ve ark., 2001; SELVER ve AYDOĞDU, 2006; TÜRKMEN ve TÜZER, 1990; UZBİLİK ve YILDIZ, 2002; UZUNAY ve SOYLU, 2006; YILDIRIM ve ark., 2006).

Bu çalışma ile halkımız tarafından kutsal sayılan Şanlıurfa Balıklıgöl sazanlarında *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* tespit edilmiştir. *Dactylogyrus sp.* ve *Trichodina sp.* dışında başka parazitlerinin bulunup bulunmadığının belirlenebilmesi ve ülkemizin güzide bir ili olan Şanlıurfa'nın simgesi haline gelmiş bu balıkların daha sağlıklı yaşayabilmesi için daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Aydoğdu A, Yıldırımhan HS, Altunel FN, (1997). *İznik Gölünde yaşayan sazan balıkları (Cyprinus carpio L.) üzerinde yaşayan bazı metazoon parazitler üzerine araştırmalar*. T Parazitol Derg. 21(4), 442-445.
2. Burgu A, Oğuz T, Körting W, Güralp N, (1988). *İç Anadolu'nun bazı yörelerinde tatlısu balıklarının parazitleri*. Etlik Vet Mikrob Derg 6(3), 143-165.
3. Cantoray R, Özcan A, (1975). *Elazığ çevresindeki tatlı su balıklarında Ligulose*. Fırat Üniv Vet Fak Derg 2, 298-301.
4. Doğanay A, Bozan H, Öge S, (1989). *Ankara'da bazı akvaryum balıklarında görülen parazitler*. AÜ Vet Fak Derg 36(2), 795-806.
5. Ekingen G, (1975). *Munzur Çayı alabalıklarında görülen bazı parazitler*. Fırat Üniv Vet Fak Derg 2, 283-290.
6. Ekingen G, (1976). *Türkiye'deki yayın ve alabalıklarda görülen bazı parazitler*. Fırat Üniv Vet Fak Derg 3(1), 112-115.
7. Karatoy E, Soylu E, (2006). *Durusu (Terkos) Gölü çapak balıkları (Abramis brama Linnaeus, 1758)'nin metazoon parazitleri*. T Parazitol Derg 30(3), 233-238.
8. Kır İ, Ayvaz Y, Barlas M, Özcan ST, (2004). *Karacaören I Baraj Gölü'nde yaşayan sazan (Cyprinus carpio L.)'lardaki parazitlerin mevsimsel dağılımları ve etkileri*. T Parazitol Derg 28(1), 45-49.
9. Kır İ, Özcan ST, (2007). *Helminth infections in common carp, Cyprinus carpio L., 1758 (Cyprinidae) from Kovada Lake (Turkey)*. T Parazitol Derg 31(3), 232-236.
10. Koyuncu E, Cengizler İ, (2002). *Mersin bölgesinde Yetiştiriciliği yapılan bazı akvaryum balıkları (Poeciliidae)'da Rastlanılan Protozoan ektoparazitler*. EÜ Su Ür Derg 19(3-4), 293-301.
11. Lucký Z, Hoffman GL, (1977). *Methods for the diagnosis of fish diseases, First edition*. Franklin Book Programs Inc., Cairo.
12. Noga EJ, (2000). *Fish Disease, Diagnosis and Treatment. First edition*. Iowa State University Press. Ames, Iowa.
13. Oğuz MC, Öztürk MO, (1993). *Kızılkanat balıklarının (Scardinius erythrophthalmus L., 1758) endohelminthleri üzerine parazitolojik bir çalışma*. T Parazitol Derg 17(3-4), 130-137.
14. Oğuz MC, Öztürk MO, Altunel FN, Ay YD, (1996). *Ulubat (Apolyont) Gölünde yakalanan sazan balıkları (Cyprinus carpio L. 1758) üzerine parazitolojik bir araştırma*. T Parazitol Derg 20(1), 97-103.
15. Öge H, (1999). *Balık tüketiminde ekonomik ve sağlık yönünden önemli parazitler*. T Parazitol Derg 23(4), 440-445.
16. Öge H, Aydın F, (1995). *Kadife balıklarında (Tinca tinca) ligulose*. T Parazitol Derg 19(2), 282-289.
17. Özcan ST, Kır İ, (2005). *Kovada Gölü havuz balığı (Carassius carassius L., 1758)'nin parazitleri üzerine bir çalışma*. T Parazitol Derg 29(3), 200-203.
18. Öztürk MO, (2005). *Eber Gölü (Afyon)'ndaki sazan (Cyprinus carpio L.)'ların parazitleri üzerine bir araştırma*. T Parazitol Derg 29(3), 204-210.
19. Öztürk MO, Altunel FN, (1995). *Ulubat (Apolyont) Gölünde yaşayan turna balıkları (Esox lucius L. 1758)'ndeki endohelminthler ve Türkiye parazit faunası için yeni bir tür kaydı*. 9. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Antalya.
20. Öztürk MO, Oğuz MC, Altunel FN, (2001). *Manyas Gölündeki kaya balıkları (Gobius fluviatilis L.)'nin metazoon parazitleri üzerine bir araştırma ve Türkiye helmint faunası için iki yeni kayıt*. T Parazitol Derg 25(1), 88-93.
21. Selver M, Aydoğdu A, (2006). *Kocadere Deresi (Bursa)'ndeki kızılkanat balıkları (Scardinius erythrophthalmus L. 1758)'nda ilkbahar ve sonbahar aylarında görülen helmintler*. T Parazitol Derg 30(2), 151-154.
22. Türkmen H, Tüzer E, (1992). *İznik Gölü sazan ve akbalıklarda sindirim kanalı helmint enfeksiyonlarının yaygınlığı*. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 18(2), 109-119.
23. Uzbilek MK, Yıldız HY, (2002). *A Report on Spontaneous Diseases in the Culture of Grass Carp (Ctenopharyngodon idella Val. 1844), Turkey*, 26, 407-410.
24. Uzunay E, Soylu E, (2006). *Sapanca Gölü'nde yaşayan sazan (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758) ve karabalık (Vimba vimba Linnaeus, 1758)'in metazoon parazitleri*. T Parazitol Derg 30(2), 141-150.
25. Yıldırım MZ, Kara D, Becer ZA, (1996). *Eğridir Gölü sudak balıklarında (Stizostedion lucioperca L. 1758) tespit edilen Bucephalus polymorphus Baer, 1827 (Trematoidea: Gasterostomata) üzerine araştırmalar*. T Parazitol Derg 20(1), 105-112.

Türkiye'de tavuk yumurtalarında organik klorlu pestisid ve poliklorlu bifenil bileşik kalıntı düzeylerinin araştırılması

Yasemin GÜREL¹, Rauf AKKAYA¹, Yusuf YİĞİT¹, Feride KOÇ², Yavuz Kürşad DAŞ³,
Ayşin BAŞSATAN YORULMAZ¹, İlnur KAHVECİ¹

¹Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara; ²Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Erzurum; ³Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Samsun.

Özet: Halk sağlığı, zirai mücadele ve veteriner hekimlikte zararlılarla mücadelede pestisidler sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar arasında zamanla zararlı ve kalıcı etkilerinin ortaya çıkması sonucu organik klor (OK)'lu pestisidlerin üretimine son verilmiş ve kullanımları yasaklanmıştır. Artık üretilmiyor olsalar dahi hidrokarbonların klorlanması ile elde edilen poliklorlu bifenil bileşik (PCB)'ler de çevrede uzun süre yapısını koruyan maddelerdir. Bu çalışmada organik klorlu pestisidlerden Alfa HCH, Heptaklor, Hezoklorobenzen (HCB), Beta-Hezoklorosikloheksan (β -HCH), Endrin, Aldrin, Heptaklorepoisit, Beta-Endosulfan (β -Endosulfan), 4,4-DDE ve 4,4-DDT ile poliklorlu bifenil bileşiklerden PCB-28'in kalıntısı gaz kromatografi mikro elektron yakalama dedektör (GC- μ ECD) cihazı ile incelenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda incelenen bileşiklere ait geri alım değerleri Alfa-Hezoklorosikloheksan (α -HCH) %86, Heptaklor %92, Hezoklorobenzen (HCB) %71, Beta-Hezoklorosikloheksan (β -HCH) %73, Endrin %80, Aldrin %75, Heptaklorepoisit %76, Beta-Endosulfan (β -Endosulfan) %70, 4,4-DDE %76, 4,4-DDT %86 ve PCB-28 için %76 olarak hesaplanmıştır. Yine aynı bileşiklerde tespit edilebilir kalıntı alt sınırı (LOD) Alfa HCH 2.49 ppb, Heptaklor 2.67 ppb, Hezoklorobenzen (HCB) 7.23 ppb, Beta-Hezoklorosikloheksan (β -HCH) 0.69 ppb, Endrin 7.89 ppb, Aldrin 3.76 ppb, Heptaklorepoisit 1.08 ppb, Beta-Endosulfan (β -Endosulfan) 2.89 ppb, 4,4-DDE 2.01 ppb, 4,4-DDT 2.67 ppb ve PCB-28 için 1.69 ppb olarak belirlenmiştir. Türkiye'nin altı ayrı ilinden bir yıl içerisinde elde edilen 230 yumurta örneğinde belirtilen organik klorlu pestisidler ve PCB-28'in kalıntısına rastlanılmamıştır.

Anahtar sözcükler: Yumurta, Organik klorlu pestisid, PCB-28, kalıntı

The Investigation of organochlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls residue levels in eggs of hens in Turkey

Summary: Pesticides are frequently used in public health, agricultural and veterinary area to control insects. In the course of time, because of occurring harmful and permanent effects, organochlorine (OK) pesticides's protection is stopped and banned. Although their production is banned, polychlorinated biphenyls (PCBs), which are gained by chlorinating hydrocarbones, are highly persistent organic pollutants. In this study, alpha-HCH, heptachlor, hexachlorobenzene (HCB), beta-hexachlorosiklohexan (β -HCH), endrin, aldrin, heptachlor epoxide, beta-endosulfane, 4,4-DDE and 4,4-DDT from organochlorine pesticides and PCB-28 from polychlorinated phenyls are studied with gas chromatography micro electron capture detector (GC- μ ECD) instrument. In these experimental studies, the recoveries of studied compounds are calculated as; alpha-hexachlorobenzene: 86 %, heptachlor: 92 % hexachlorobenzene (HCB): 71 %, beta-hexachlorocyclohexane (β -HCH): 71 %, endrin: 80 %, aldrin: 75 %, heptachlor epoxide: 76 %, beta-endosulfan(β -endosulfan): 70 %, 4,4-DDE: 76 %, 4,4 DDT: 86 % and PCB-28: 76 %. In these compounds limit of detection (LOD) is determined as, alfa HCH: 2.49 ppb, heptachlor 2.67 ppb, hexachlorobenzene (HCB),:7.23 ppb, beta- hexachlorocyclohexane (β -HCH): 0.69 ppb, endrin: 7.89 ppb, aldrin:3.76 ppb, heptachloro epoxide: 1.08 ppb, beta-endosulfane: 2.89 ppb, 4,4-DDE: 2.01 ppb, 4,4-DDT: 2.67 ppb and PCB-28: 1.69 ppb. There isn't any defined organochlorine pesticides and PCB-28 residue in 230 egg samples that are collected from six provinces of Turkey.

Key words: Egg, organochlorine pesticides, PCB-28, residue

Giriş

Hayvanlar, bitkiler veya tarım ürünleri ile bunların çevresinde kullanılan ilaç ve kimyasal maddelerin çoğu, uygulandıkları alan ve canlı vücudunda kısmen parçalanıp, etkisiz hale gelirken, organik klorlu (OK) bileşikler, poliklorobifeniller (PCB),

polibromobifeniller, metallere, bazı mantar ilaçları son derece yavaş ayrışıp, bunlarda giderek artan miktarlarda birikirler ve böylece besin zinciri yoluyla son tüketici olan insana ulaşırlar (KAYA ve ark., 2002b). Kullanma amacının dışında pestisidler insan ve hayvanlarda akut, subakut ve kronik zehir-

lenmeler ile mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etki meydana getirirler. Buna ek olarak geniş boyutlu çevre ve besin kirlenmesine yol açarlar (KAYA ve ark., 1996). Bu etkilerden kaçınmak için besinlerdeki ilaç ve kimyasal madde kalıntı düzeylerini ortaya koymak amacı ile son derece duyarlı ve güvenilir analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Gıda ve Tarım Örgütü (GTÖ), Avrupa Birliği'nin ilgili komisyonları, ABD'deki Besin ve İlaç İdaresi gibi kuruluşlar (FDA), yaptıkları çalışmalarla, tüketici sağlığının korunması için ilaç kalıntılarının yol açabilecekleri ekonomik ve sosyal yönlü olumsuzluklarının önlenmesi amacı ile çalışmakta, diğer ülkelerle birlikteliğin sağlanması yönünde çaba sarf etmektedirler (KAYA ve ark., 2002b).

OK pestisidler 1940-1950'li yıllarda keşfedilmiş ve zararlı mücadelesi amacı ile kullanılmaya başlanmıştır. Bu bileşikler arasında DDT, metoksiklor, klordan, heptaklor, aldrin, dieldrin, endrin, toksafen, mireks ve lindan sayılabilir. OK pestisidler sinir zehiri olup, sinirlerde iletimi engelleyerek akut toksisiteye sebep olurlar. DDT 1874 yılında sentezlenmesine rağmen 1939 yılına kadar pestisid olarak kullanılmamıştır. İsveçli bir kimyager olan Dr. Paul Mueller DDT'nin pestisid etkisini göstererek Nobel ödülü kazanmıştır. II. Dünya savaşı süresince tifüs ve sıtma gibi böcekler tarafından insanlara taşınan hastalıkların mücadelesinde kullanılmıştır. Savaş sonrası zirai mücadele, halk sağlığı ve ev kaynaklı zararlıların kontrolü amacı ile yaygın olarak kullanılmıştır. Kalıcı etkisi ortaya çıkınca ABD'de 1972 yılında yasaklanmıştır (COPE ve ark., 2004).

Poliklorlu bifenil (PCB) bileşikler Aromatik maddelerin çeşitli oranlarda klorlanması ile elde edilmiş sentetik bileşiklerdir. Isı, ışık gibi çevre şartlarına son derece dayanıklıdır. Ticari olarak Araclor 1254, Phenoclor olarak bilinirler. Hava, toprak ve su ekosistemlerine girip çevre ve besin kirlenmesine yol açarlar. Solunum, deri ve sindirim yolu ile vücuda girerler. Sindirimle kısa sürede emilip dolaşıma karışırlar. Özellikle yağ doku üzere vücutta birikirler. Canlılar üzerine etkileri OK pestisidlere benzer. Başta vahşi yaşam üzere hayvanlara üremeyi bozarlar. Karaciğerde ME'lerin artmasına neden olurlar. Tümoral oluşumlara neden olurlar. Östrojenik etki oluştururlar. Porfiriye sebep olurlar. Bağışıklık sistemini baskırlar. Araclor

1254 kanatlı yemlerine 20 ppm katıldığında yumurta veriminde düşme, civciv çıkma oranının azalması ve teratojenik etkilere yol açar. Balıklar PCB'lere oldukça hassastırlar. Suda 20-50 ppb PCB'ye birkaç hafta süre ile maruz kalan turna balıklarında ölüm görülmüştür (KAYA ve ark., 2002a).

Materyal ve Metot

Yumurta Örnekleri

Çalışmada kullanılan örnekler Türkiye'de yumurtacı tavukların yaygın olarak yetiştirildiği Afyon, Ankara, Balıkesir, Çorum, Kayseri ve Konya illerinden laboratuvarımıza gönderilmiştir. Yaz ve kış aylarında ayrı olarak alınan toplam 230 örnekte OK pestisid ve PCB-28 kalıntısı araştırılmıştır. Yumurta örneklerinin alındığı işletme ve alındıkları mevsimler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Örneklerin temin edildikleri işletme ve mevsimler (2005-2006 yılları arasında)

İşletme	Yaz	Kış
Çorum Yumurta Tav. Ltd. Şti.	20	20
Afyon Başmakçı Tav Ltd. Şti.	20	20
Kayseri Kaytaş Tav. Ltd. Şti.	20	20
Bandırma Bozlar Tav. Ltd. Şti.	20	20
Konya Ergürbüz Tav. Ltd. Şti.	20	20
Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü	30	-

Örneklerin Hazırlanması

QuEChERS Metod örneklerin hazırlanmasında kullanılmıştır (ANASTASSIADES ve ark., 2003). Belirtilen metoda göre, homojenizatörde (IKA T25) bir örnek hale getirilen yumurta numunelerinden 0.5 g örnek alınmıştır. Alınan örneğin üzerine 2 g Susuz sodyum sülfat (Merck 1.06639) eklenmiştir. Örnek 1 g florisil içeren hazır kartuştan (Supelco 20280-u) geçirilmiştir. Örneğin kartuştan geçirilmesi öncesinde şartlandırma uygulanmamıştır. Florisil kartuşun ilk aşamada OK pestisidler ve PCB bileşiği (PCB-28)'ni bünyesinde tuttuğu kabul edilmiştir. Bu aşamada cihaz (GC) kolonunda kirlilik oluşturabilecek maddelerin kartuştan geçerek atılmasına izin verilmiştir. Florisil kartuşta tutulan bileşikler 10 ml %1 Aseton (Merck 1.00012) eklenmiş asetonitril (Merck 1.00030) ile bir cam tüpe alınmıştır. Alınan

örnek solüsyonu azot altında uçurma sisteminde (VLM EVA IVIS) 50°C'de 0.5 ml kalıncaya kadar yoğunlaştırılmıştır. 0.5 ml'lik kalıntı GC-mikro-ECD cihazına enjekte edilmiştir.

Gerİ Alım (Recovery) Çalışması

Gerİ alım çalışmasında kullanılmak amacı ile Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden alınan yumurtalar, OK pestisid ve PCB-28 yönünden analiz edilmiştir. OK pestisid ve PCB-28 içermediği belirlenen yumurtaların analiz kromatogramları negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda bu yumurtalardan 6'lı gruplar oluşturularak toplam 18 örneğe 25 ppb, 50 ppb ve 100 ppb yoğunluğunda OK pestisid ve PCB-28 standardı (Dr. Ehrenstorfer) eklenmiştir. GC-mikro-ECD cihazında OK pestisid ve PCB-28 standartlarının geliş zamanları belirlenmiştir. Dört ayrı yoğunlukta (100 ppb, 250 ppb, 500 ppb ve 1000 ppb) hazırlanan standart kromatogramlarından kalibrasyon eğrileri çizilerek korelasyon katsayısı (R^2) değerleri tespit edilmiştir. Gerİ alım çalışması için hazırlanan örnekler, hazırlama işleminden geçirilerek GC-mikro-ECD cihazına enjekte edilmiştir. Standart ile gerİ alım çalışmasının kromatogramları karşılaştırılarak maddelerin

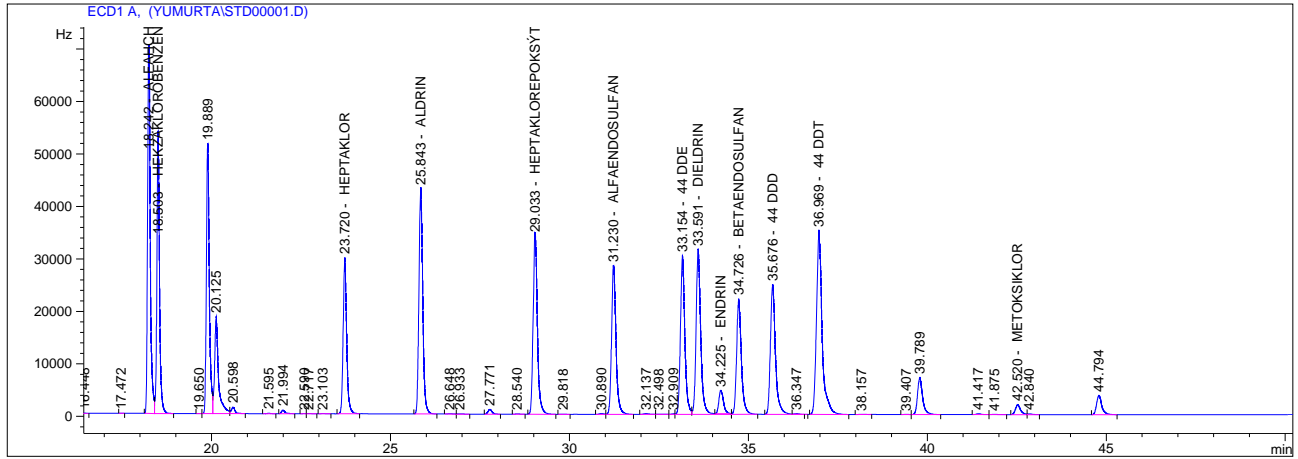
gerİ alım yüzde ortalama ve relatif standart sapma (RSD) değerleri belirlenmiştir.

Gaz Kromatografi-Mikro-ECD (GC- μ ECD) Cihaz Şartları

Örneklerden elde edilen final solüsyonların gaz kromatografi mikro-ECD dedektör cihazında analizi için Pelosi ve arkadaşlarının cihaz yönteminden faydalanılmıştır (PELOSI ve ark., 2002). Belirtilen yöntem göre, enjektör bloğu sıcaklığı: 240°C; kolon başlangıç sıcaklığı: 60°C'dir. Başlangıç sıcaklığında bekleme süresi 2 dakikadır. Başlangıç sıcaklığından 20°C/dk hızla 250°C/dk final sıcaklığına çıkmıştır. Cihazda enjeksiyon modu splitless olarak uygulanmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 μ L; Taşıyıcı gaz (azot) akış hızı: 1 ml/dk'dır. Cihaz kolon tipi HP -5, %5 metil silikon ve kolon boyutları 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m'dir.

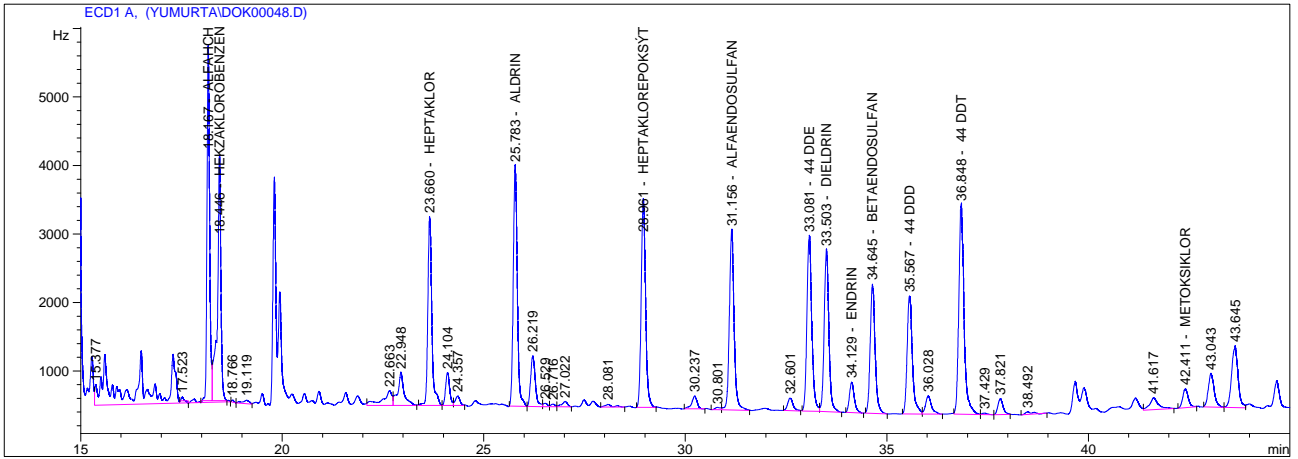
Bulgular

OK pestisidlere ait 1 ppm yoğunlukta standart kromatogramı Şekil 1'de gösterilmiştir.



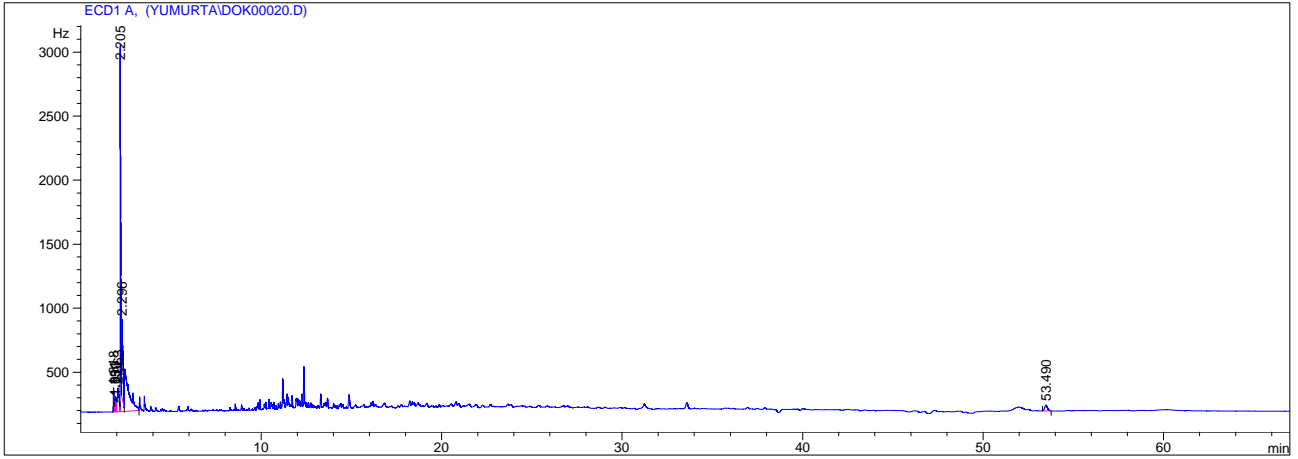
Şekil 1. OK pestisidlere ait standart kromatogramı.

100 ppb yoğunlukta standart eklenmiş örneğin gerİ alım kromatogramı Şekil 2'de gösterilmiştir.



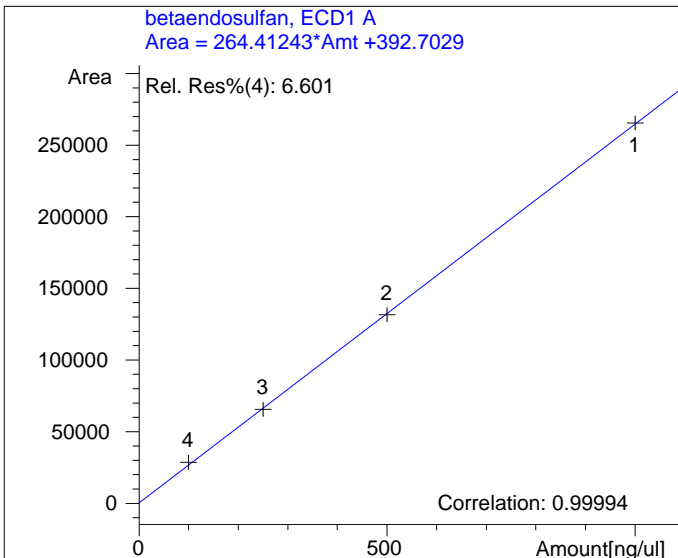
Şekil 2. 100 ppb standart eklenmiş örneğin geri alım kromatogramı.

OK pestisid ve PCB-28 yönünden temiz örnek kromatogramı Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. OK insektisid ve PCB-28 kalıntısı içermeyen örnek kromatogramı.

Beta-endosülfan standardına ait kalibrasyon grafiği örnek olarak Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Beta-endosülfanın kalibrasyon grafiği.

OK insektisidler (25 ppb) ve PCB-28 (100 ppb)'e ait % geri alım, relatif standart sapma, tespit limiti ve korelasyon katsayı (R^2) değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. OK insektisidler (25 ppb) ve PCB-28 (100 ppb)'e ait % geri alım, relatif standart sapma, tespit limiti ve korelasyon katsayı (R^2) değerleri.

	Geri alım (%)	RSD (%)	LOD (ppb)	(R^2) (0.1-1 ng/ μ l)
Alfa HCH	86	3.86	2.49	0.999
Heptaklor	92	4.19	2.67	0.999
Hekzaklorobenzen	71	0.0015	7.23	0.999
Beta-HCH	73	1.65	0.69	0.999
Endrin	80	0.0012	7.89	0.999
Aldrin	75	0.0010	3.76	0.999
Heptaklorepoksit	76	3.70	1.08	0.999
β - endosulfan	70	4.05	2.89	0.999
4,4-DDE	76	2.67	2.01	0.9998
4,4-DDT	86	3.70	2.67	0.99467
PCB-28	76	3.02	1.69	0.99996

Örneklerin analizinde tespit limitlerinin (LOD) üzerinde OK insektisid ve PCB-28'in kalıntısına rastlanmamıştır.

Tartışma ve Sonuç

1986-1988 yılları boyunca Kanada 'da toplam 602 hayvansal ürün organik klorlu, organik fosforlu ve endüstriyel organik kirleticiler açısından analiz edilmiştir. Bunların 147 tanesi kümes hayvanı, 9 tanesi de tavuk yumurtası olarak belirlenmiştir. Toplam örneğin %35'inde pentaklorofenole rastlanılmıştır. DDE %21 ve diğerleri ise %10'dan daha az görülmüştür. Örneklerin %43'ünde kalıntıya rastlanmamıştır (FRANK ve ark., 1990).

1995 yılında Hindistan'da beyaz Leghorn ırkı tavukların yemlerine değişen dozlarda (6.25 ile 50 mg/kg) DDT katılarak 37 hafta boyunca yedirilmiştir. Uygulama süresince en yüksek kalıntı yağda, bunu takiben karaciğer, kalp, yağlı et, kan, dalak, testis, beyin ve yumurta sarısında tespit edilmiştir (GEORGE ve ark., 1995).

Kenya'da yapılan bir çalışmada tavuk yağlarında organik klorlu pestisidler (Lindane, Dieldrin, DDT) tespit edilmiştir. Ülkenin 7 coğrafik bölgesinden 105 örnek toplanmış ve sonuçlar maksimum kalıntı limitlerinin altında bulunmuştur. Kenya'da kanatlı yumurtaları üzerinde yapılan bir çalışmada 367 örnek incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda 10

örnekte pestisid kalıntısına rastlanılmıştır (KAHUNYO ve ark., 1986).

Çin'de GC-ECD ile yapılan bir çalışmada yumurtalarda p,p'-DDE, p,p'-DDT ve düşük miktarlarda (10 ng/g'den az) PCB'ler tespit edilmiştir (AN ve ark., 2002).

İspanya'da Ulusal Donana Parkındaki 53 adet Flamingo yumurtasında yapılan çalışmalarda p,p'-DDT, p,p'-DDE ve PCB'ler tespit edilmiştir (GUITART ve ark., 2005).

Bu çalışmada pozitif örnekle karşılaşılması, tavukların OK pestisidler ve PCB-28 yönünden risk altında olmadığı ve ülkemizde en ucuz hayvansal protein olarak fazlaca tüketilen yumurtanın belirtilen maddeler yönünden insanlar tarafından güvenle tüketilebileceği kanaatine varılmıştır.

Bilindiği gibi ülkemiz Avrupa Birliğine giriş sürecinde bulunmaktadır. Bu çalışma ile ülkemizde tüketilen yumurtaların güvenilirliğinin belirlenmesinin yanı sıra, Avrupa Birliği ile yaşanan kalıntı problemlerinin çözümüne katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizde bugüne kadar yumurtalarda böyle bir detaylı çalışma yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışma ile birlikte ülkemizde

yumurtada pestisid kalıntılarına bakılabileceği ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. **Anastassiades M, Lehotay S, Stajnbaher D, Schenck F**, (2003). *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J AOAC Int. 86 (2), 412-31.
2. **An Q, Dong YH, Wang H, Jin W**, (2002). *Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners residues in eggs by gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD)*. Se Pu . 20 (2), 167-71.
3. **Cope WG, Liedy RB, Hodgson E**, (2004). *Classes of Toxicants: Use Classes. Chapter 5. Alınmıştır Editör: E.HODGSON. A Textbook of Modern Toxicology*. Third edition. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. Hoboken, New Jersey.
4. **Frank R, Braun HE, Stonefield KI, Rasper J**, (1990). *Organochlorine and organophosphorus residues in the fat of domestic farm animal species, Ontario, Canada*. Food additives and Contaminants. 7 (5), 629-636.
5. **George VT, Sundararaj A**, (1995). *Studies on residue of DDT in poultry*. Indian Veterinary Journal, 72 (1),17-20.
6. **Guitart R, Clavero R, Mateo R, Manez M**, (2005). *Levels of persistent organochlorine residues in eggs of greater flamingos from the Guadalquivir marshes (Donana), Spain*
7. **Kahunyo JM, Maitai CK**, (1986). *Organochlorine pesticide residues in chicken fat*. Poultry Science. 65 (6), 1084-1089.
8. **Kaya S, Bilgili A**, (1996). *Pestisidler ve yol açabilecekleri başlıca sorunlar*. Türk Vet. Hek. Derg. 8 (4), 28-38.
9. **Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A, (Editörler)** (2002a). *Pestisidler. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. 2.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara. Syf. 385-535.
10. **Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A, (Editörler)** (2002b). *Besinlerdeki ilaç kalıntıları. Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji*. 2. Cilt, 3.Baskı, Medisan Yayınevi. Ankara. Syf. 713-743
11. **Pelosi P, Stefanelli P, Attard BD, Generali T, Amendola G, Girolimetti S, Vanni F, Di Muccio A**, (2002). *Methods for organochlorine, organophosphorus, pyrethroid and carbamate pesticide residues in foods of animal origin*. The Italian National Reference Laboratory (Pesticide Residues Section of the ISS) - Istituto Superiore di Sanità (National Institute of Health) - Roma.

Evcil ve yabani kanatlılardan izole edilen Newcastle Hastalığı viruslarının patotiplendirilmesi

Asiye DAKMAN¹, Metin GÜLEÇ¹, Elçin GÜNAYDIN¹, Mustafa COŞAR¹

¹Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara-Türkiye

Özet: Kanatlı sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olan Newcastle hastalığının (ND) klinik seyri virusun patojenitesi ile doğrudan ilgilidir. Velojenik suşlar önemli klinik bulgular ve yüksek mortaliteye sebep olurken, mezojenik ve lentojenik suşların meydana getirdiği hastalık nispeten daha hafif seyirli olmaktadır. Ayrıca virusun patojenitesini belirlemek epidemiyolojik açıdan da büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada 2007 yılında Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde izole ve identifiye edilen toplam 39 adet ND virusunun patojenitesi belirlendi. Virus izolasyon ve identifikasyonunda RT-PCR, Spesifik patojen free (SPF) embriyolu tavuk yumurtasına ekim, Hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testi uygulandı. ND virusunun patotiplendirilmesinde Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) yöntemi kullanıldı.

Köy tavuklarından izole edilen 28 ND virusunun tamamı velojenik olarak belirlendi. Evcil güvercinlerden izole edilen 4 adet ND virusunun 3'ünün mezojenik, 1'inin lentojenik olduğu tespit edildi. Yabani güvercinlerden izole edilen 5 adet NDV suşunun 2'sinin velojenik, 3'ünün ise mezojenik, yabani kumrularından izole edilen 2 adet ND virusunun ise mezojenik olduğu tespit edildi. Yabani güvercinlerden velojenik suşların izole edilmesi ülkemizde virusun sirkülasyonunda yabani kuşların önemine dikkat çekmektedir.

Anahtar sözcükler: Newcastle Disease Virus, evcil kanatlı, yabani kuş, patotiplendirme.

Pathotyping of the Newcastle Disease virus strains isolated from the domestic and wild birds

Summary: The clinical symptoms of the Newcastle disease (ND) that cause considerable losses in poultry sector are directly related to the pathogenicity of the virus. When the velogenic strains cause severe clinical findings and higher mortality, disease caused by mesogenic and the lentogenic strains is relatively in a moderate mode. Also, determination of the pathogenicity of the virus represents a great importance for the epidemiological meaning. In this study the pathogenicity of the 39 ND viruses isolated and identified in Etlik Central Veterinary Control and Research Institute in 2007 was determined. For the isolation and identification of the virus, reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR), inoculation of the samples into the Specific Pathogen Free (SPF) embryonated eggs, and haemagglutination inhibition (HI) test were performed. The Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) test were used for the pathotyping of the ND viruses.

All of the 28 ND viruses isolated from the backyard poultry were determined as velogenic. Three of the four ND viruses isolated from the domestic pigeons were found be mesogenic, and the remaining one was lentogenic. Two of the five ND strains isolated from the wild pigeons were determined as velogenic, and three of the five were determined as mesogenic. The virus isolated from the two doves was found to be mesogenic. The isolation of the velogenic strains from the wild pigeons shows the importance of the wild birds for the circulation of the ND viruses in Turkey.

Key words: Newcastle Disease Virus, Poultry, Wild Bird, pathotypical characterization

Giriş

Paramyxoviridae familyasının *Avulavirus* genusunda yer alan *Avian Paramyxoviruslar* (PMV) 1-9'a alt gruba ayrılmıştır. Newcastle hastalığı (ND) *Avian PMV-1* tarafından oluşturulan çok bulaşıcı ve öldürücü seyreden, kanatlılarda solunum sindirim ve sinir sistemi bozuklukları ile karakterize viral bir hastalıktır. İlk kez 1926 yılında tanımlanan ND günümüzde tüm dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır

(ALEXANDER, 2003; ANONİM, 2008). Türkiye'de ilk ND salgınının 1946 yılında tanımlanmasından sonra hastalık günümüzde de varlığını sürdürmektedir (ÇÖVEN ve ÇARLI, 1997; ÇÖVEN ve ark., 2004; ÖZDEMİR, 1992).

Newcastle hastalığından korunmada canlı ve inaktif aşılardan beri kullanılmaktadır (ALEXANDER, 2003; Jordan, 1996). Ülkemizde de ND aşılı hastalıklardan korunmada etkin bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak hastalığın çevrede dağı-

lımı, maternal antikor düzeyi, hayvanların yetiştirme yönü, aşılama zamanı, aşılama yöntemi, seçilen aşı suşu gibi faktörler bağışıklık düzeyini ve etkinliğini doğrudan etkilemektedir (AKAN ve ark., 1999).

Hastalığa tavuklar başta olmak üzere aralarında güvercin ve kumruların da bulunduğu 250'nin üzerinde kuş türünün duyarlı olduğu saptanmıştır (JORDAN, 1996; ALDOUS ve ALEXANDER, 2001). Hastalık tavuklarda olduğu gibi güvercinlerde de oldukça akut seyretmektedir. Güvercinlerde görülen vakaların çoğunun tavuklarda şekillenen ND salgınları sırasında güvercinlerin infekte tavuklarla teması sonucu gerçekleştiği saptanmıştır (ANONİM, 1986). Gerek dünyada (ALDOUS ve ark., 2004; MEULEMANS ve ark., 2002) gerekse ülkemizde ND hastalığının güvercinlerdeki durumunu araştıran yayınlar mevcuttur (ÖNCEL ve ark., 1997; ÇÖVEN ve ark., 1999; MUTLU, 1997).

Newcastle virusları infekte hayvanlarda hastalığın klinik seyrine göre 5 gruba ayrılmaktadırlar (ALEXANDER, 2003).

1. *Visserotropik velojenik*: Hemorajik sindirim sistemi lezyonları görülen yüksek patojen form

2. *Neurotropik velojenik*: Sinirsel ve solunum sistemi bozuklukları görülen ölüm oranı yüksek form

3. *Mesojenik*: Solunum bozuklukları ve nadiren sinirsel bozuklukların görüldüğü ölüm oranı düşük form

4. *Lentojenik*: Orta şiddette veya subklinik solunum sistemi enfeksiyonunun bulunduğu form

5. *Aseptomatik enterik*: Genellikle subklinik sindirim bozukluklarının görüldüğü form

Virusun patotiplendirmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Avrupa Birliği Konseyi Direktifi (EU Council Directive) 92/66/EEC'e göre izole edilen ND viruslarının Intracerebral Patojenite İndeksinin (ICPI) belirlenmesi gerekmektedir. Günümüzde 'gene sequencing' yöntemi ile etkenin patojenesini belirlemek kabul edilen geçerli diğer bir yöntemdir (ANONİM, 2008). Hastalığın ND olarak bildirilmesi için; *Avian PMV-1* olarak tiplendirilmesi ve izole edilen virusun ICPI sonucu 0.7 ve üzerinde olması gerekmektedir (ANONİM, 1992).

Bu çalışmada Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Teşhis

Laboratuvarında 2007 yılında çeşitli kanatlı hayvanlardan izole edilen ve teyit amacıyla diğer enstitülerden gönderilen toplam 39 adet ND virusunun ICPI testi ile patotiplendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Test edilen örnekler: Laboratuvara gelen hasta veya ölü kanatlı hayvanlardan nekropsi sırasında alınan iç organlardan hazırlanan inokulum ikiye bölünerek bir kısmı Reverse- Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), diğer kısmı ise etken izolasyonu için kullanıldı. Ayrıca teyit amacı ile diğer enstitülerden gelen allantoik sıvıdaki virus örnekleri çalışmada kullanıldı.

RT-PCR: Aldous ve ark. (2003)'nın bildirdikleri yöntem modifiye edilerek yapıldı. Şüpheli marazi maddeden ve allantoik sıvıdan ticari kit kullanılarak (Qiagen; QIAamp Viral RNA Mini Kit, 52906) RNA izolasyonu yapıldı. PCR aşaması OneStep RT-PCR kiti (Qiagen; OneStep RT-PCR kit, 210212) kullanılarak yapıldı. RT-PCR işleminde kullanılan reaksiyon hacimleri şu şekildedir: 12.5 µl 2x Rxn mix (her dNTP'den 0.4 mM, 3.2 mM MgSO₄ içermektedir) (Invitrogen; SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase, 12574-026), 7,5 µl deionize su, 1 µl Taq Mix (Invitrogen; Superscript™ III RT/Paltinum Taq Mix), 1'er µl primerler (20 pmol/ µl), 2 µl templeyt olmak üzere toplam reaksiyon hacmi 25 µl'dir. Termal cyclus'da uygulanan ısı döngüleri şu şekildedir: RT; 50°C 30 dk, 95°C 15 dk, 40 siklus; 94°C 1 dk, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn, Final uzama; 72°C 5 dk. Reaksiyon sonunda % 2 'lik agaroz jelde (Seakem; Seakem LE agarose, 50004L), 90V'da 30 dk sürüyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı ve oluşan bantlar UV transilliminator (Ultra-violet products/UVP) ve jel dokümantasyon sistemi (Biotech Image Master-VDS+ Fuiifilm Termal Imagine System FTI-500) yardımı ile görüntüledi. Oluşan PCR ürünlerinin büyüklüğü yaklaşık 700 bp olarak belirlendi.

Tablo 1: PZR' de kullanılan primer dizinleri ve elde edilen ürün büyüklükleri.

Kullanılan primerler	Ürün Büyüklüğü
(MSF1)5'- GACCGCTGACCACGAGGTTA-3'	700 bp
(#2) 5'-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC-3'	(Aldous ve ark., 2003)

Virus İzolasyonu: Office International Epizootics (OIE) Manual'de bildirilen yönteme göre yapıldı (Anonim, 2008). Laboratuvara gelen Avian Influenza (AI) ve/veya ND şüpheli kanatlılara ait iç organlardan hazırlanan inokulumdan 0.1-0.2 ml 9-11 günlük embriyolu Spesifik Patogen Free (SPF) tavuk yumurtasının allantoik boşluğuna inokule edildi. Yumurtalar 5 gün 37°C'de inkube edildi ve embriyo ölümleri takip edildi. Ölen embriyoların allantoik sıvıları toplandı. Virusun varlığı Hemaglutinasyon (HA) testi ile değerlendirildi. Embriyo ölümlerinin şekillenmediği yumurtaların ise en az 2 kez pasajları yapıldı. Pasajların sonunda ölüm olmadığı takdirde örnekler negatif olarak değerlendirildi.

Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi (HI): OIE Manual'de bildirilen yönteme göre yapıldı (ANONİM, 2008). HA pozitif olduğu belirlenen allantoik sıvılar Avian influenza H5, H7 ve NDV (PMV-1) spesifik standart antiserumları (VLA-Weybridge) ile test edildi.

Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) Testi: OIE Manual'de bildirilen yönteme göre yapıldı (ANONİM, 2008). En az 16 HAU gösteren ND virusları 1/10 sulandırıldı ve 0.1 ml/civciv olmak üzere 10 adet 1 günlük SPF civcive intracerebral olarak inokule edildi. Kontrol grubuna ise 0,1 ml PBS inokule edilerek hayvanlar izolatorlerde 8 gün süre ile gözlem altında tutuldu. Her gün düzenli olarak kontrol edilen hayvanların durumu normal: 0, hasta:1 ve ölü:2 olmak üzere skorlandı. Index sonucu 0,7'den küçük olanlar lentojenik, 0.7-1.5 arası mesojenik ve 1.5'in üzeri velojenik olarak belirlendi (ALLAN ve ark., 1978).



Resim 1. ICPI testinin uygulanması.



Resim 2. ICPI testinde kullanılan izolator.

Bulgular

RT-PCR: Bu çalışmada 14 ilden gelen 75 kanatlıdan alınan marazi maddelerden hazırlan inokulumlara RT-PCR uygulandı. 75 örneğin 26 (%34.66) adeti RT-PCR ile ND (PMV-1) pozitif olarak saptandı. Ayrıca teyit amaçlı gönderilen ND şüpheli 12 adet izolatin tamamı yapılan RT-PCR sonucunda ND pozitif bulundu.

Virus İzolasyonu: 9-11 günlük ETY'a yapılan ekimler sonucu 75 örneğin 29'unda embriyonun öldüğü ve toplanan CAS'ların HA pozitif olduğu görüldü. Ayrıca teyit amaçlı gönderilen 12 adet ND şüpheli izolatin da ETY'a yapılan ekimleri sonrasında, tamamının embriyoyu öldürdüğü ve HA pozitif olduğu tespit edildi.

Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi (HI): HA pozitif bulunan 29 izolat standart PMV-1 antiserumu kullanılarak HI ile test edildi ve 27 (%93.1)'i ND pozitif bulundu. Ayrıca teyit amaçlı gönderilen ND şüpheli 12 izolatin tamamı HI ile ND pozitif bulundu.

Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) Testi: Bu çalışmada izole ve identifiye edilen 27 adet ve diğer enstitülerde izole edilip teyit amacı ile gönderilen 12 adet olmak üzere toplam 39 adet ND virusu tiplendirildi. Köy tavuklarından izole edilen 28 ND virusunun tamamı velojenik olarak belirlendi. Evcil güvercinlerden izole edilen 5 adet ND virusunun 4'ünün mesojenik, 1'inin lentojenik olduğu tespit edildi. Yabani güvercinlerden izole edilen 5 adet NDV suşunun 2'sinin velojenik, 3'ünün

ise mezojenik, yabancı kumrularından izole edilen 2 adet ND virusunun ise mezojenik olduğu belirlendi.

Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne bağlı illerden AI ve ND şüphesi ile gelen 75 adet kanatlı örneğinin 27 (%36)'sinden ND(PMV-1) izole ve identifiye edildi. Bu bölgede 2007 yılında görülen ND vakalarının 16'sı (% 59.25) köy tavuklarına ait iken geri kalan ND viruslarının 5'i (% 18.51) evcil güvercin, 5'si (%)

yabancı güvercin ve 2'si (% 7.4) ise kumrudan izole edildi. Diğer Enstitülerden gönderilen 12 ND virusunun tamamı köy tavuğu kökenlidir.

Enstitüye bağlı bölgedeki köy tavuklarına ait laboratuvar sonuçları Tablo-2, evcil güvercinlere ait sonuçlar Tablo.3 ve yabancı kuşlara ait laboratuvar sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. Ayrıca diğer enstitülerden teyit amaçlı gönderilen izolatlara ait laboratuvar sonuçları Tablo 5'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Köy tavuklarından izole edilen ND viruslarının laboratuvar sonuçları.

N	İzolat Kodu*	Kanatlı Türü	Marazi Madde Orijini	RT-PZR	HI**	ICPI
1	ND/Chicken/TR/37/Küre-1/01.07	Tavuk	Kastamonu	+	2 ⁷	1,8250
2	ND/Chicken/ TR/ 74/Merkez-1/02.07	Tavuk	Bartın	+	2 ⁸	1,8600
3	ND/Chicken/ TR/ 67/Çaycuma-1/02.07	Tavuk	Zonguldak	+	2 ⁸	1,8620
4	ND/Chicken/ TR/ 37/Şenpazar-1/02.07	Tavuk	Kastamonu	+	2 ⁸	1,8750
5	ND/Chicken/ TR/ 37/Taşköprü-1/02.07	Tavuk	Kastamonu	+	2 ⁹	1,9300
6	ND/Chicken/ TR/ 74/Ulus-1/02.07	Tavuk	Bartın	+	2 ⁸	1,8870
7	ND/Chicken/ TR/37/Doğanyurt-1/02.07	Tavuk	Kastamonu	+	2 ⁹	1,9700
8	ND/Chicken/ TR/ 67/Çaycuma-2/02.07	Tavuk	Zonguldak	+	2 ⁸	1,7750
9	ND/Chicken/ TR/ 06/Haymana-1/03.07	Tavuk	Ankara	+	2 ¹¹	1,8870
10	ND/Chicken/ TR/ 06/Mamak-1/03.07	Tavuk	Ankara	+	2 ¹¹	1,7500
11	ND/Chicken/ TR/ 50/Avanos-1/03.07	Tavuk	Nevşehir	+	2 ⁷	1,8750
12	ND/Chicken/ TR/ 06/Kalecik-2/04.07	Tavuk	Ankara	+	2 ¹⁰	1,8750
13	ND/Chicken/ TR/ 37/Şenpazar-2//02.07	Tavuk	Kastamonu	+	2 ⁸	1,8750
14	ND/Chicken/ TR/ 53/Ardeşen-1/04.07	Tavuk	Rize	+	2 ¹⁰	1,8870
15	ND/ Chicken / TR/ 06/Çubuk-1/06.07	Tavuk	Ankara	+	2 ⁸	1,8750
16	ND/Chicken/ TR/ 74/ Merkez-2/07.07	Tavuk	Bartın	+	2 ⁹	1,9620

*: Suşların Uluslararası Referans laboratuvarında kayıtlı kodları

**I:Suşların HI titresini Avian PMV-1 antiserumu ile Log₂ 2'ye göre hesaplanmıştır.

Tablo 3. Evcil güvercinlerden izole edilen ND viruslarının laboratuvar sonuçları

İzolat Kodu	Kuş Türü	Marazi mad-denin Orijini	RT-PZR	HI**	ICPI
ND/Domestic pigeon/TR/06/Y.Mahalle-2/04.07	Güvercin	Ankara	+	2 ⁸	0,5370
ND/Domestic pigeon/TR/06/Çankaya-1/05.07	Güvercin	Ankara	+	2 ⁷	1,0125
ND/ Domestic pigeon/TR/18/Merkez-1/06.07	Güvercin	Çankırı	+	2 ⁸	0,8250
ND/ Domestic pigeon /TR/06/Altındağ-1/07.07	Güvercin	Ankara	-	2 ⁹	1,0120

*: Suşların Uluslar arası Referans laboratuvarında kayıtlı kodları

**I:Suşların HI titresini Avian PMV-1 antiserumu ile Log₂ 2'ye göre hesaplanmıştır

Tablo 4. Yabani kuşlardan izole edilen ND viruslarının laboratuvar sonuçları

İzolat Kodu	Kuş Türü	Marazi maddenin Orijini	RT-PZR	HI**	ICPI
ND/Dove/TR/ 06/Kalecik-1//02.07	Kumru	Ankara	+	2 ⁷	1,4000
ND/ Dove/TR/ 06/Etimesgut-1//02.07	Kumru	Ankara	+	2 ⁹	1,3870
ND/Wild pigeon/TR/40/Mucur-1//02.07	Güvercin	Kırşehir	+	2 ⁹	1,4750
ND/ Wild pigeon / TR/06/Sincan-1//02.07	Güvercin	Ankara	+	2 ⁸	1,4250
ND/Wild pigeon/TR/06/Y.Mahalle-1/04.07	Güvercin	Ankara	+	2 ⁸	1,9000
ND/Wild pigeon /TR/06/Altındağ-2/07.07	Güvercin	Ankara	+	2 ⁷	1,9750
ND/Wild pigeon/TR/06/Y.Mahalle-3/09.07	Güvercin	Ankara	+	2 ⁹	1,1750

*: Suşların Uluslar arası Referens laboratuvarında kayıtlı kodları

**I:Suşların HI titresi Avian PMV-1 antiserumu ile Log₂ 2'ye göre hesaplanmıştır.

Tablo 5. Diğer enstitülerden teyit amaçlı gönderilen ND viruslarının laboratuvar sonuçları

N	İzolat Kodu*	Kanatlı Türü	Marazi Madde Orijini	RT-PZR	HI**	ICPI
1	ND/Chicken/ TR/ 21/Çermik-1/02.07	Tavuk	Diyarbakır	+	2 ⁷	1,8700
2	ND/Chicken/ TR/ 72/Kozluk-1/03.07	Tavuk	Batman	+	2 ⁹	1,8870
3	ND/Chicken/ TR/ 73/Merkez-1/03.07	Tavuk	Şırnak	+	2 ⁷	1,6870
4	ND/Chicken/ TR/ 21/Dicle-1/03.07	Tavuk	Diyarbakır	+	2 ⁷	1,8870
5	ND/Chicken/ TR/ 21/Dicle-2/03.07	Tavuk	Diyarbakır	+	2 ⁷	1,9120
6	ND/Chicken/ TR/ 21/Dicle-3/03.07	Tavuk	Diyarbakır	+	2 ⁷	1,8750
7	ND/Chicken/TR/24/Kemaliye-1/03.07	Tavuk	Erzincan	+	2 ⁸	1,8750
8	ND/Chicken/ TR/ 29/Kelkit-1/03.07	Tavuk	Gümüşhane	+	2 ⁹	1,8750
9	ND/Chicken/ TR/ 76/Merkez-1/04.07	Tavuk	Iğdır	+	2 ¹²	1,5620
10	ND/Chicken/ TR/ 73/Merkez-2/04.07	Tavuk	Şırnak	+	2 ¹³	1,7370
11	ND/Chicken/ TR/ 30/Merkez-1/06.07	Tavuk	Hakkari	+	2 ⁹	1,7750
12	ND/Chicken/ TR/ 13/Merkez-1/07.07	Tavuk	Bitlis	+	2 ¹¹	1,8750

*: Suşların Uluslar arası Referens laboratuvarında kayıtlı kodları

**I:Suşların HI titresi Avian PMV-1 antiserumu ile Log₂ 2'ye göre hesaplanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde 1940'lı yıllardan beri varlığını sürdüren Newcastle hastalığı tavuklarda yapılan sistematik aşılama programlarına rağmen zaman zaman salgınlar halinde ortaya çıkmakta ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

ND teşhisinde virus izolasyonu halen büyük önem taşımaktadır. Ancak moleküler tekniklerin gelişmesiyle beraber virusu üretmeden varlığını ortaya koymak mümkün olmaktadır. Bu da hastalık teşhisinin çok kısa sürede yapılmasına olanak sağlar. Özellikle ND gibi pek çok salgın hastalığın çabuk ve güvenilir yöntemlerle teşhis edilmesi hastalıkla

mücadelede başarı oranını artırmaktadır. Bu çalışmada virus izolasyon yöntemi ile 39 ND pozitif sonuç alınırken RT-PCR yöntemi ile 38 örnek ND pozitif bulunmuştur. Çoğu organ ve dokularda RNA inhibitörlerinin bulunması zaman zaman yanlış negatif sonuçlara yol açmaktadır (WILDE ve ark., 1990). Ayrıca enfeksiyondan uzun bir süre sonra gelişen antikorların virusu nötralize etmesi nedeniyle etken izolasyonunun mümkün olmadığı durumlarda da RT-PCR ile teşhis yapılabileceği bildirilmektedir (GOHM ve ark., 2000). Ancak RT-PCR ile alınan sonuçların virus izolasyonu ile doğrulanması teşhisin güvenilirliğini artırmaktadır. Ayrıca

ICPI testi ile virusu tiplendirebilmek için etken izolasyonunun yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada bir yıllık dönemde izole edilen ND virusu sayısı dikkat çekicidir. Ancak ülkemizde ilk kez 2005 yılı sonunda görülen Avian influenza salgını ile beraber şüpheli her türlü vakanın kısa sürede ilgili makamlara bildirilmesi ve laboatuvarlara ulaştırılması, bu vakaların belirlenmesinde etkili bir faktör olarak düşünülebilir. 2007 yılında NDV izolasyonu gerçekleştirilen tavuk sürüleri arasında ticari işletme bulunmamaktadır. İzolasyonlar köy tavuklarından gerçekleştirilmiştir. Ticari işletmelerde yoğun ve düzenli aşı programları uygulanmakta ve tavuk yetiştiriciliğinin genellikle kapalı sistemlerde yapılarak yabani kuşlarla temas asgari düzeyde tutulmaya çalışılmaktadır. Ancak köy tavuklarında düzenli aşılama, etkin bir koruma ve kontrol uygulaması bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalığın köy tavuklarında ticari işletmelere göre daha yüksek düzeyde ortaya çıkması beklenen bir sonuçtur ve bu çalışmada elde edilen sonuçlar bu görüşü destekler niteliktedir.

Bu çalışmada köy tavuklarından izole edilen virusların tamamı velojenik NDV olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak; Öncel ve ark. (1997), yapmış oldukları bir çalışmada Güney Marmara bölgesindeki köy tavuklarından izole ettikleri ND viruslarının da velojenik olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada evcil ve yabani güvercinlerdeki 9 vakada NDV izole edilmiş ve yabani güvercinlerden izole edilen 2 NDV izolatının velojenik olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda güvercinlerde hastalığın varlığı ortaya konulmuştur (ÇÖVEN ve ark., 1999, MUTLU, 1997, ÖZDEMİR, 1992). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda güvercinlerden izole edilen ND viruslarının patotiplendirmesi yapılmış ve velojenik oldukları bildirilmiştir (ÖNCEL ve ark., 1997; ÖZDEMİR, 1992; BARUT, 2005), yapmış olduğu çalışmada Türkiye'den izole edilen suşların İngiltere ve Çin gibi uzak ülkelerden izole edilen suşlarla yakınlığını tespit etmiş, hastalığın yayılmasında uluslar arası kanatlı ve kanatlı ürünleri ile kafes kuşları ve güvercin ticaretinin önemli yer tuttuğu fikrini (ALDOUS ve ark., 2003) destekler mahiyette sonuçlar almıştır. Türkiye'den izole edilen suşların Çin'de kazlardan izole edilen suşla benzer bulunması, hastalık etkenini vücutlarında barındırmakla

beraber klinik belirti göstermeyen su kuşlarının gerek göçleri gerekse ithalat ve ihracatları sırasında Newcastle hastalığının farklı bölgelerdeki kanatlı hayvanlara bulaştırılmasında önem arz ettiğini ve yabani kuşlar üzerinde yapılacak kontrollerin önemini vurgulamaktadır (BARUT, 2005). Güvercinlerin hastalığın yayılmasında önemli rolleri olduğu bilinmektedir (ALEXANDER, 2003). Güvercinlerde ND salgını ilk kez 1970'li yıllarda Orta Asya'da ortaya çıkmış, 1981'de Avrupa'da görüldükten sonra hızla dünyaya yayılmıştır (KALETA ve ark., 1985; ALEXANDER ve ark., 2003). Hastalık pek çok ülkedeki evcil güvercinlerde enzootik olarak bulunmakta, yabani güvercinler ve kumrulara yayılmaktadır. Bu nedenle hastalık, kümes hayvanlarını tehdit etmeye devam etmektedir. Yapılan bu çalışmada kumrular da ND virusu izole edilmiştir. Çöven ve ark. 1999, yılında yapmış oldukları çalışmada kumrular da NDV izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; ülkemizde Newcastle hastalığı köy tavuklarında önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Yabani güvercinlerden velojenik ND virusunun izole edilmesi hastalığın yayılmasında önemli risk teşkil etmektedir. Yabani kuşlarda hastalığın bulunması, köy tavukları kadar ticari işletmeler içinde önemli bir tehdit unsurudur. Ülkemizde yabani kuşlarda hastalığın durumunun araştırılması ve bu çalışmada izole edilen suşların filogenetik analizlerinin yapılması gerek ülkemizde gerekse dünyada hastalığın epidemiyolojik durumunun belirlenmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Akan M, Keskin O, İlhan Z, Dakman A, Kökçü L, (1999). *Newcastle Hastalığına Karşı Aşılama Denemeleri*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 46 (2-3), 242-248
2. Aldous EW, Fuller CM, Mynn JK and Alexander D.J. (2004). *A molecular epidemiological investigation of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons*. Avian Pathol 32 (2), 258-269.
3. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ, (2003). *A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene*. Avian Pathol 32, 239-257.
4. Aldous EW, Alexander DJ, (2001). *Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1)*. Avian Pathol., 30, 117-128.
5. Alexander DJ, (2003). *Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections*. Saif

- Y.M.ed. Disease of Poultry. 11th Edition Iowa State Press. p.63-87
6. **Allan WH, Lancaster JE, Toth B**, (1978). *Newcastle disease vaccines*. FAO
 7. **Anonim**, (1986). *Avian Paramyxovirus Type 1(NDV) Infection in Pigeons and Spread to Domestic Poultry in Great Britain*. MAFF,CVL Report
 8. **Anonim**, (2008). *Newcastle disease* in OIE Manual of Standard's for Diagnostic tests and vaccines. 576-589. Erişim: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
 9. **Anonim**, (1992). *Introducing Community measures for the control of Newcastle disease* in Council Directive 92/66/EEC
 10. **Barut T**, (2005). Kanatlı hayvanlarda Newcastle hastalığı viruslarının reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ile teşhisi ve moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
 11. **Çöven F, Alexander DJ, Mısırhoğlu Z, Özdemir İ**, (1999). *Güvercinlerde Paramyxovirus-1 Enfeksiyonunun Araştırılması*. Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg 24, 1-10.
 12. **Çöven F, Çarlı T**, (1997). *Gumboro salgınlarında Reovirus, Adenovirus ve Newcastle hastalığı virus izolasyonu*. Pendik Vet Kont Araşt Enst Yayını 2, 153-161.
 13. **Çöven F, Ruth Manvell, Orhan G, Çöven N, Genç A**, (2004). *Yumurtacı ve broyler sürülerde görülen Newcastle Hastalığı olgularından Avian Paramyxovirusların izolasyonu ve identifikasyonu*. VI.Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Kongre Özet Kitabı , 222.
 14. **Gohm DS, Thur B, Hofmann MA**, (2000). *Detection of Newcastle virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR*. Avian Pathol. 29, 143-152.
 15. **Jordan FT**, (1996). *Poultry Disease*. Fourth edition. WB Saunders Company Ltd. London, p.469-483.
 16. **Kaletta EF, Alexander DJ, Russel PH**, (1985). *The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons*. Avian Pathol 553-557.
 17. **Meulemans G, van den Berg TP, Decaesstecker M, Boschmans M**, (2002). *Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains*. Avian Pathol 31, 515-519.
 18. **Mutlu ÖF**, (1997). *Evcil güvercinlerde (Columba Livia Gmel.1789 var.Domestica) Paramyxovirus -1 enfeksiyonları üzerine seroepidemiolojik çalışmalar*. Bornova Vet. Kontr ve Araşt Enst Md Derg, 22 (36), 73-84.
 19. **Öncel T, Alexander DJ, Manvell RJ, Türe O**, (1997). *Characterization of Newcastle Diseases Viruses isolated from chickens and pigeons in the South Marmara region of Turkey*. Avian Path 26, 129-137.
 20. **Özdemir İ**, (1992). *Current new-castle disease situation in Turkey*. *Workshop On Avian Paramyxovirus. Proceedings*. Rauschholzhausen, July, 27-29;109-116. Germany
 21. **Wilde J, Eiden J, Yolken R**, (1990). *Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A Rotaviruses by reverse transcriptase and p.c.r*. J. Clin Microbiol 28,1300-1307.

Genetic analysis of highly pathogenic Avian Influenza A (HPAI) H5N1 viruses isolated from Turkey between 2005 and 2008

Hikmet ÜN

Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Summary: An outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza A (HPAI) H5N1 infection was first reported on 07 October 2005 in Turkey. There was a single outbreak in free range turkeys in the west side of the country on the Aegean coast in Kızıksa Village of Manyas District of Balıkesir Province. Following this outbreak, there were new outbreaks in different regions of Turkey respectively in December 2005, 2006, 2007 and 2008.

This study provides a characterization of HPAI H5N1 viruses isolated from Turkey that caused between 2005 and 2008. A phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene showed that the Turkish HPAI H5N1 isolates were genetically closely related to the Asian lineage.

Key words: Avian Influenza Viruses, H5N1, diagnosis, Turkey

Türkiye’de 2005-2008 yılları arasında izole edilen kuş gribi viruslarının genetik analizi

Özet: Türkiye’de Yüksek Patojen Kuş Gribi H5N1 enfeksiyonu ilk olarak 07 Ekim 2005 tarihinde rapor edildi. Hastalık Balıkesir ili Manyas ilçesi Kızıksa Köyünde bir hindi çiftliğinde tek bir vaka olarak şekillendi. Bu vakayı takiben 2005, 2006, 2007 ve 2008 yıllarında Türkiye’nin değişik bölgelerinde yeni vakalar şekillendi.

Bu çalışmada 2005 ve 2008 yılları arasında Türkiye’de izole edilen Yüksek Patojen Kuş Gribi H5N1 viruslarının karakterizasyonları yapılmıştır. Bu izolatların Haemagglutinin geninin kısmi filogenetik analizi genetik olarak Asya’da bulunanlar ile yakın ilişkide olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Kuş Gribi Virusları, H5N1, Teşhis, Türkiye

Introduction

HPAI (H5N1) virus infection was announced in 1996 in China. HPAI (H5N1) virus is isolated from a farmed goose in Guangdong Province, China in 1996. Human infections with HPAI (H5N1) are reported in Hong Kong in 1997. Research on viruses isolated from dead birds in Qinghai Lake in 2005 demonstrates transmission of the virus among migratory geese and suggests that the virus may be carried along winter migratory routes. Disease spread out to everywhere year to year and some human cases occurred (Table 1)

(www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_08_12_08.pdf).

The disease was first reported on 07 October 2005 in Turkey. There was a single outbreak in free range turkeys in the west side of the country on the Aegean coast in Kızıksa Village of Manyas District of Balıkesir Province. The outbreak was successfully controlled without any local or long-distance spread. This isolate (DQ407519) was sequenced and analysed by VLA Weybridge (BROWN, 2006).

Table 1. Distribution of human cases of HPAI (H5N1) between December 2003 and April 2006 (WHO, 2006).

Country	Onset of first reported case	Onset of last reported case	Number of cases	Number of deaths
Viet Nam	December 2003	November 2005	91	42
Thailand	January 2004	November 2005	22	14
Cambodia	January 2005	March 2006	6	6
Indonesia	July 2005	March 2006	32	24
China	October 2005	April 2006	18	12

Turkey	December 2005	January 2006	12	4
Iraq	January 2006	January 2006	2	2
Azerbaijan	February 2006	March 2006	8	5
Egypt	March 2006	April 2006	12	4
Total			203	113

Following the initial outbreak, a second outbreak was confirmed in domestic poultry on 25 December 2005, in the east of the country, Aralik that is in the district of Iğdir Province. Between the dates of 25 December 2005 and 31 March 2006, Turkey had 230 confirmed cases of Avian Influenza, 229 of which were of HPAI (H5N1) virus and 1 of which was of Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) H7N1 virus. Amongst these outbreaks, 200 outbreaks had occurred in domestic poultry and 30 cases were in wildbirds. Also, some human avian influenza infection occurred in 2006; this human case was one of the first confirmed reports of outside Asia and Africa.

Similar outbreaks occurred in neighboring countries of Turkey and Europe (Table 2) (www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_08_12_08.pdf).

Outbreaks of HPAI H5N1 have been reported for wildlife and poultry in Turkey and neighbouring countries since 2005. A phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene showed that the HPAI H5N1 isolates from Turkey were of avian origin and contained the hemagglutinin gene of the Asian lineage. The virus isolates in the EU and the neighbouring countries appear to be genetically closely related to the Asian lineage of the virus that has been isolated in China (Qinghai Lake), Russia (Southern Siberia) and Mongolia.

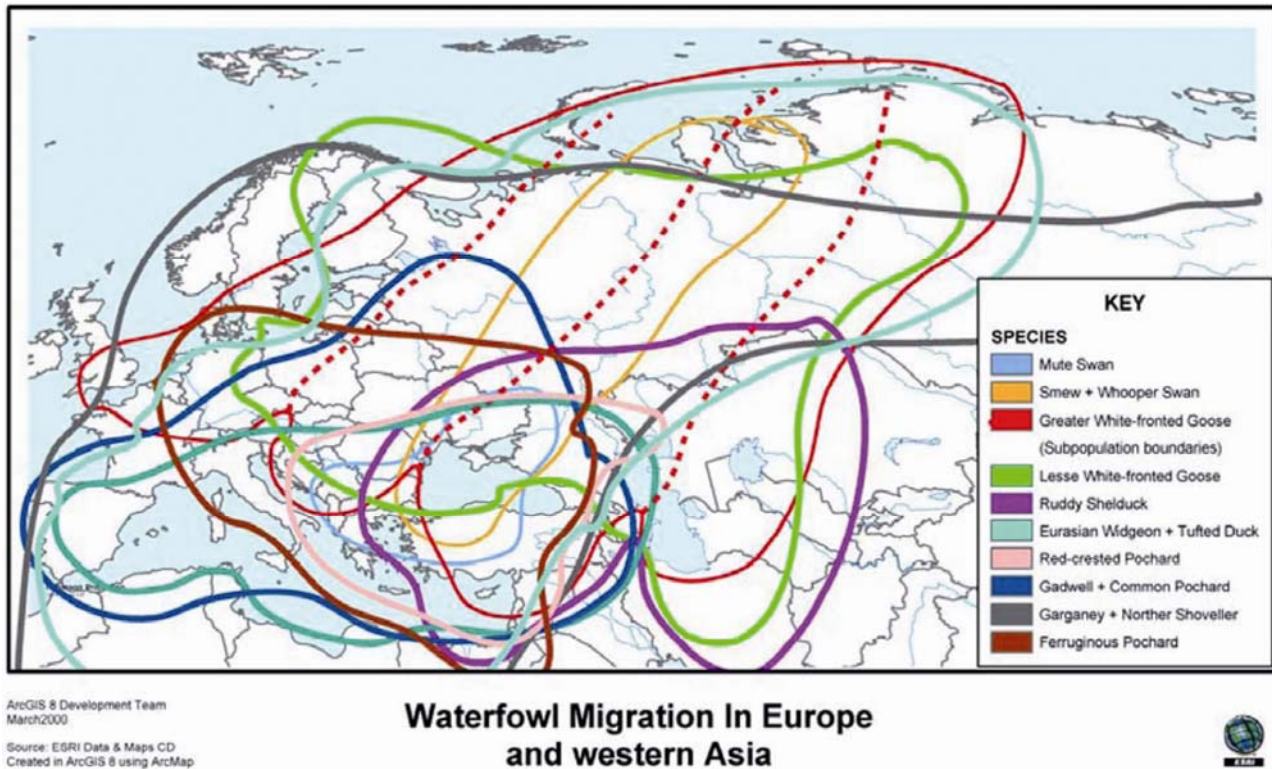
Table 2. HPAI detection in Europe (Brown, 2006).

Country (estimated 1st report)	Wild birds	Poultry
Turkey (Oct 2005)	+	+
Romania (Oct 2005)	+	+
Croatia (Oct 2005)	+	-
Ukraine (Dec 2005)	?	+
Azerbaijan (Jan 2006)	+	+
Bulgaria (Jan 2006)	+	-
Greece (Jan 2006)	+	-
Italy, Austria, Slovenia, Bosnia- H, Hungary, Poland, Slovakia, Sweden, Switzerland, Denmark, Albania, Serbia-Montenegro, Slovenia, UK (to April 2006)	+	-/+
France, Germany	+	+

They are distinguishable from the apparently chicken-adapted strains infecting domestic poultry in Turkey. This situation is also supported by wild bird immigration routes (SABIROVIC et al., 2006). The reports of the virus finding in dead migratory waterbirds raised concerns on the potential role of

these birds in the rapid dissemination of the virus over large geographic distances. Migratory waterbirds have been thought of a potential for the introduction of HPAI H5N1 virus to the countries (Figure 1).

Figure 1. Waterfowl immigration routes (Sabirovic et al., 2006).



Material and Method

Viruses. Total 173 virus isolates were used in this study (Table 3). The virus isolates analyzed in this study were isolated from domestic backyard and wild birds from the infected premises in Turkey. Viruses were detected by virus isolation in embryonating chicken eggs (ECEs). The isolates were typed as HPAI H5N1 viruses by hemagglutinin inhibition (HI) and neuraminidase inhibition tests with a panel of reference antisera (OIE, 2008). Viruses were received by the Veterinary Control and Research Institutes in Turkey (Bornova / İzmir, Pendik / İstanbul and Etlik Central / Ankara) in the form of tissue or allantoic fluid from 9-10 day-old SPF embryonated chicken eggs or RNA extract.

RNA Extraction and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction: RNA was extracted

using QIAamp RNA extraction kits (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instruction. Primers were selected to recognise regions of hemagglutinin gene of the Avian Influenza A Virus as described by WHO (www.who.int/csr/diseases/ai). Amplification was performed with the forward primer H5F (5'- GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC -3') and reverse primer H5R (5'- CTC CCC TGC TCA TTG CTA TG -3'). All reactions were performed using SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA according to the manufacturer's instruction (Invitrogen, USA). The PCR amplicons were visualised by Ethidium bromide staining after electrophoresis through 2% agarose gel (Sigma-Aldrich, Germany). The PCR products were separated in an agarose gel by electrophoresis and purified using QIAquick gel extraction kits (QIAGEN, Germany).

Table 3. HPAI (H5N1) viruses used in this study and GenBank accession numbers.

Sequence ID	Specific Host	Collection Date	GenBank Accession Number
HPAI (H5N1) viruses in Turkey in 2006			
A/WildDuck/Turkey/06/Beyazari/33/2006	WildDuck	2006	EU542733
A/Chicken/Turkey/56/Pervari/684/2006	Chicken	2006	EU542734
A/Chicken/Turkey/56/Merkez/683/2006	Chicken	2006	EU542735
A/Chicken/Turkey/56/Kurtalan/1458/2006	Chicken	2006	EU542736
A/Chicken/Turkey/06/Bala/1675/2006	Chicken	2006	EU542737
A/Chicken/TR/06/cubuk/1680/2006	Chicken	2006	EU542738
A/Turkey/TR/37/Merkez/1696/2006	Turkey	2006	EU542739
A/WildDuck/TR/37/Abana/1703/2006	WildDuck	2006	EU542740
A/Chicken/TR/36/Merkez/1542/2006	Chicken	2006	EU542741
A/Chicken/TR/55/Terme/17/2006	Chicken	2006	EU542742
A/Chicken/TR/60/Niksar/26/2006	Chicken	2006	EU542743
A/Duck/TR/61/Merkez/36/2006	Duck	2006	EU542744
A/Chicken/TR/55/Bafra47/2006	Chicken	2006	EU542745
A/Owl/TR/60/Niksar/187/2006	Owl	2006	EU542746
A/WildSwan/TR/74/Amasra/2005/2006	WildSwan	2006	EU542747
A/Pigeon/TR/21/Merkez/1334/2006	Pigeon	2006	EU542748
A/Turkey/TR/21/Merkez/1340/2006	Turkey	2006	EU542749
A/Chicken/TR/21/Merkez/1338/2006	Chicken	2006	EU542750
A/Turkey/TR/36/Merkez/1598/2006	Turkey	2006	EU542751
A/Sparrow/TR/55/Bafra/1095/2006	Sparrow	2006	EU542752
A/Chicken/TR/25/Merkez/1584/2006	Chicken	2006	EU542753
A/Chicken/TR/57/Boyabat/1081/2006	Chicken	2006	EU542754
A/Chicken/TR/55/Vezirkopru/1082/2006	Chicken	2006	EU542755
A/Chicken/TR/53/Cayeli/1085/2006	Chicken	2006	EU542756
A/WildSwan/TR/55/Merkez/929/2006	WildSwan	2006	EU542757
A/Turkey/TR/72/Merkez/1282/2006	Turkey	2006	EU542758
A/Duck/TR/21/Silvan/1201/2006	Duck	2006	EU542759
A/Turkey/TR/21/Silvan/1209/2006	Turkey	2006	EU542760
A/Chicken/TR/21/Silvan/1212/2006	Chicken	2006	EU542761
A/Duck/TR/21/Bismil/1219/2006	Duck	2006	EU542762
A/Chicken/TR/73/Silopi/1329/2006	Chicken	2006	EU542763
A/Chicken/TR/23/Merkez/1331/2006	Chicken	2006	EU542764
A/Chicken/TR/62/Cemisgezek/1336/2006	Chicken	2006	EU542765
A/Chicken/TR/21/Cermik/996/2006	Chicken	2006	EU542766
A/Chicken/TR/55/Merkez/10/2006	Chicken	2006	EU542767
A/Duck/TR/61/Merkez/35/2006	Duck	2006	EU542768
A/WildBird/TR/55/Bafra/29/2006	WildBird	2006	EU542769
A/Chicken/TR/60/Yesilyurt/939/2006	Chicken	2006	EU542770

A/Chicken/TR/55/Tekkekoy/1014/2006	Chicken	2006	EU542771
A/Chicken/TR/55/Tekkekoy/1068/2006	Chicken	2006	EU542772
A/Chicken/TR/55/19Mayis/1072/2006	Chicken	2006	EU542773
A/Goose/TR/66/Akdagmadeni/1543/2006	Goose	2006	EU542774
A/Goose/TR/36/Selim/1547/2006	Goose	2006	EU542775
A/Chicken/TR/55/Atakum/1083/2006	Chicken	2006	EU542776
A/Chicken/TR/55/Carsamba/1076/2006	Chicken	2006	EU542777
A/Chicken/TR/55/Terme/1075/2006	Chicken	2006	EU542778
A/Chicken/TR/55/Terme/1041/2006	Chicken	2006	EU542779
A/Chicken/TR/55/Bafra/1040/2006	Chicken	2006	EU542780
A/Chicken/TR/55/Carsamba/1037/2006	Chicken	2006	EU542781
A/Sparrow/TR/55/Bafra/1096/2006	Sparrow	2006	EU542782
A/Chicken/TR/55/Tekkekoy/1015/2006	Chicken	2006	EU542783
A/Chicken/TR/05/Merkez/1058/2006	Chicken	2006	EU542784
A/Chicken/TR/55/Bafra/1062/2006	Chicken	2006	EU542785
A/Chicken/TR/55/Terme/1065/2006	Chicken	2006	EU542786
A/Chicken/TR/55/Merkez/1067/2006	Chicken	2006	EU542787
A/Chicken/TR/55/Terme/1069/2006	Chicken	2006	EU542788
A/Chicken/TR/55/Terme/1071/2006	Chicken	2006	EU542789
A/Chicken/TR/55/Terme/1070/2006	Chicken	2006	EU542790
A/Chicken/TR/55/Terme/1073/2006	Chicken	2006	EU542791
A/Chicken/TR/55/Tekkekoy/1074/2006	Chicken	2006	EU542792
A/Chicken/TR/53/Merkez/1078/2006	Chicken	2006	EU542793
A/Chicken/TR/55/carsamba/1080/2006	Chicken	2006	EU542794
A/Chicken/TR/55/Asarcik/1084/2006	Chicken	2006	EU542795
A/Chicken/TR/57/Turkeli/1086/2006	Chicken	2006	EU542796
A/Chicken/TR/55/Tekkekoy/1087/2006	Chicken	2006	EU542797
A/Pigeon/TR/05/Merkez/1090/2006	Pigeon	2006	EU542798
A/Chicken/TR/55/Bafra/1091/2006	Chicken	2006	EU542799
A/Chicken/TR/57/Merkez/1092/2006	Chicken	2006	EU542800
A/Chicken/TR/60/Zile/1093/2006	Chicken	2006	EU542801
A/Duck/TR/60/Yesilyurt/1094/2006	Duck	2006	EU542802
A/Chicken/TR/55/Alacam/1097/2006	Chicken	2006	EU542803
A/WildBird/TR/55/Bafra/ist1/2006	WildBird	2006	EU542804
A/Pigeon/TR/55/Samsun/ist2/2006	Pigeon	2006	EU542805
A/Chicken/TR/58/Sarkisla/ist3/2006	Chicken	2006	EU542806
A/Chicken/TR/53/Limankoy/ist4/2006	Chicken	2006	EU542807
A/Chicken/TR/57/Lalakoy/ist5/2006	Chicken	2006	EU542808
A/WildBird/TR/52/Unye/ist6/2006	WildBird	2006	EU542809
A/Chicken/TR/57/Kabali/ist7/2006	Chicken	2006	EU542810
A/Chicken/TR/60/Niksar/ist8/2006	Chicken	2006	EU542811

A/Chicken/TR/55/Bafra/ist9/2006	Chicken	2006	EU542812
A/Chicken/TR/60/Tokat/ist10/2006	Chicken	2006	EU542813
A/Chicken/TR/52/Aydintepe/ist11/2006	Chicken	2006	EU542814
A/Chicken/TR/55/Yaylacati/ist12/2006	Chicken	2006	EU542815
A/Chicken/TR/60/Cikrik/ist13/2006	Chicken	2006	EU542816
A/Chicken/TR/55/Taflan/ist15/2006	Chicken	2006	EU542817
A/WildBird/TR/55/Samsun/ist16/2006	WildBird	2006	EU542818
A/Chicken/TR/55/Hurriyet/ist17/2006	Chicken	2006	EU542819
A/Chicken/TR/55/Sirinkoy/ist18/2006	Chicken	2006	EU542820
A/Chicken/TR/55/Ilica/ist19/2006	Chicken	2006	EU542821
A/Chicken/TR/55/Ucpinar/ist20/2006	Chicken	2006	EU542822
A/Chicken/TR/53/Baskoy/ist21/2006	Chicken	2006	EU542823
A/Turkey/TR/55/Cetinkaya/ist22/2006	Turkey	2006	EU542824
A/Chicken/TR/55/Kaygusuz/ist23/2006	Chicken	2006	EU542825
A/Chicken/TR/53/Derbent/ist24/2006	Chicken	2006	EU542826
A/Chicken/TR/55/Koruluk/ist25/2006	Chicken	2006	EU542827
A/Chicken/TR/55/Yaylacati/ist26/2006	Chicken	2006	EU542828
A/WildBird/TR/55/Kurupelit/ist27/2006	WildBird	2006	EU542829
A/Chicken/TR/57/Cakildak/ist28/2006	Chicken	2006	EU542830
A/HouseSparrow/TR/55/Ladik/ist29/2006	HouseSparrow	2006	EU542831
A/Chicken/TR/55/Camalan/ist30/2006	Chicken	2006	EU542832
A/Chicken/TR/53/Pazar/ist31/2006	Chicken	2006	EU542833
A/Chicken/TR/57/Doguca/ist32/2006	Chicken	2006	EU542834
A/WildBird/TR/55/Engiz/ist33/2006	WildBird	2006	EU542835
A/Chicken/TR/55/Kuscular/ist34/2006	Chicken	2006	EU542836
A/Chicken/TR/53/Komurculer/ist35/2006	Chicken	2006	EU542837
A/Chicken/TR/53/Ocak/ist36/2006	Chicken	2006	EU542838
A/Chicken/TR/55/Ucpinar/ist37/2006	Chicken	2006	EU542839
A/Chicken/TR/55/Koseli/ist38/2006	Chicken	2006	EU542840
A/WildBird/TR/55/Carsamba/ist39/2006	WildBird	2006	EU542841
A/WildBird/TR/55/Bafra/ist40/2006	WildBird	2006	EU542842
A/Chicken/TR/55/Bafra/ist42/2006	Chicken	2006	EU542843
A/Chicken/TR/55/Belalcin/ist53/2006	Chicken	2006	EU542844
A/Chicken/TR/55/Samsun/ist54/2006	Chicken	2006	EU542845
A/Chicken/TR/59/Begendik/ist918/2006	Chicken	2006	EU542846
A/Chicken/TR/22/Enez/ist929/2006	Chicken	2006	EU542847
A/Chicken/TR/34/Baklali/ist955/2006	Chicken	2006	EU542848
A/Chicken/TR/34/Silivri/ist962/2006	Chicken	2006	EU542849
A/Chicken/TR/34/B.Cekmece/ist980/2006	Chicken	2006	EU542850
A/Chicken/TR/41/Goncaaydin/ist982/2006	Chicken	2006	EU542851
A/Chicken/TR/22/Esetce/ist986/2006	Chicken	2006	EU542852

A/Chicken/TR/57/Yalikoy/ist81/2006	Chicken	2006	EU542853
A/Chicken/TR/34/Sirapinar/ist706/2006	Chicken	2006	EU542854
A/Chicken/TR/59/Misinli/ist582/2006	Chicken	2006	EU542855
A/Chicken/TR/34/K.Cekmece/ist55/2006	Chicken	2006	EU542856
A/Chicken/TR/34/GOP/ist56/2006	Chicken	2006	EU542857
A/Chicken/TR/63/Hilvan/ist271/2006	Chicken	2006	EU542858
A/Chicken/TR/56/Siirt/Bor399/2006	Chicken	2006	EU542859
A/Chicken/TR/15/Burdur/Bor453-1/2006	Chicken	2006	EU542860
A/Chicken/TR/49/Bulanik/Bor463/2006	Chicken	2006	EU542861
A/Chicken/TR/72/Batman/Bor543/2006	Chicken	2006	EU542862
A/Chicken/TR/21/Diyarbakir/Bor544/2006	Chicken	2006	EU542863
A/Chicken/TR/72/Kozluk/Bor545/2006	Chicken	2006	EU542864
A/Chicken/TR/72/Kozluk/Bor546/2006	Chicken	2006	EU542865
A/Quail/TR/72/Batman/Bor547/2006	Quail	2006	EU542866
A/Chicken/TR/21/Diyarbakir/Bor548/2006	Chicken	2006	EU542867
A/Chicken/TR/72/Kozluk/Bor549/2006	Chicken	2006	EU542868
A/Chicken/TR/21/Diyarbakir/Bor550/2006	Chicken	2006	EU542869
A/Chicken/TR/21/Ergani/Bor551/2006	Chicken	2006	EU542870
A/Chicken/TR/44/Kale/Bor552/2006	Chicken	2006	EU542871
A/Chicken/TR/65/Ozalp/Bor553/2006	Chicken	2006	EU542872
A/Chicken/TR/63/Viransehir/Bor577-1/2006	Chicken	2006	EU542873
A/Chicken/TR/42/Aksehir/Bor623/2006	Chicken	2006	EU542874
A/Chicken/TR/68/Aksaray/Bor624/2006	Chicken	2006	EU542875
A/Chicken/TR/42/Karatay/Bor625/2006	Chicken	2006	EU542876
A/Chicken/TR/23/Palu/Bor653/2006	Chicken	2006	EU542877
A/Chicken/TR/23/Elazig/Bor654/2006	Chicken	2006	EU542878
A/Chicken/TR/44/Malatya/Bor655/2006	Chicken	2006	EU542879
A/Chicken/TR/44/Malatya/Bor656/2006	Chicken	2006	EU542880
HPAI (H5N1) viruses in Turkey in 2007			
A/Chicken/Turkey/72/Gercus/329/2007	Chicken	2007	EU542881
A/Chicken/Turkey/21/Silvan/386/2007	Chicken	2007	EU542882
A/Chicken/Turkey/72/Merkez/367/2007	Chicken	2007	EU542883
A/Chicken/Turkey/72/Merkez/439/2007	Chicken	2007	EU542884
A/Goose/Turkey/21/Bismil/446/2007	Goose	2007	EU542885
A/Chicken/Turkey/21/Bismil/447/2007	Chicken	2007	EU542886
A/Chicken/Turkey/72/Merkez/449/2007	Chicken	2007	EU542887
A/Chicken/Turkey/72/Besiri/450/2007	Chicken	2007	EU542888
A/Chicken/Turkey/72/Merkez/451/2007	Chicken	2007	EU542889
A/Turkey/Turkey/21/Bismil/452/2007	Turkey	2007	EU542890
A/Chicken/Turkey/21/Bismil/453/2007	Chicken	2007	EU542891
A/Chicken/Turkey/21/Silvan/455/2007	Chicken	2007	EU542892

A/Chicken/Turkey/72/Merkez/481/2007	Chicken	2007	EU542893
A/Chicken/Turkey/72/Merkez/494/2007	Chicken	2007	EU542894
A/Sparrow/Turkey/72/Merkez/495/2007	Sparrow	2007	EU542895
A/Chicken/Turkey/21/Silvan/543/2007	Chicken	2007	EU542896
A/Chicken/Turkey/72/Merkez/562/2007	Chicken	2007	EU542897
A/Turkey/Turkey/72/Kozluk/606/2007	Turkey	2007	EU542898
A/Chicken/Turkey/72/Kozluk/607/2007	Chicken	2007	EU542899
A/Chicken/Turkey/72/Besiri/608/2007	Chicken	2007	EU542900
A/Turkey/Turkey/72/Kozluk/609/2007	Turkey	2007	EU542901
HPAI (H5N1) viruses in Turkey in 2008			
A/Chicken/Turkey/67/Caycuma/1027/2008	Chicken	2008	EU542902
A/Chicken/Turkey/67/Caycuma/1212/2008	Chicken	2008	EU542903
A/Chicken/Turkey/55/Samsun/1750/2008	Chicken	2008	EU542904
A/Chicken/Turkey/55/Samsun/1751/2008	Chicken	2008	EU542905

Sequence Analysis: The products of positive PCR amplification were sequenced by cyclesequencing reactions using ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit chemistry with template, H5F (3.2 pmoles) or primer H5R (3.2 pmoles) and BigDye® Ready Reaction Mix according to the manufacturer's instruction. Sequenced products were cleaned with a DyeEx 2.0 Nucleospin nucleotide removal kit (QIAGEN, Germany). Automated fluorescence sequencing was performed with an ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Phylogenetic Analysis: The sequences were edited and aligned using CLC COMBINEDWB3

software (CLC, 2007). Further sequences of HPAI H5N1 isolate from Turkey and neighbouring countries were obtained from GenBank (Table 4). Additional Asian-like H5N1 sequences, used for comparison, were obtained from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (Table 4). The phylogenetic tree (Figure 2) was generated using CLC COMBINEDWB3 software. Phylogenetical analysis was done by using HA partial gene sequences. Phylogenetical tree was built by Neighbor-Joining method; matrix of distances was counted with p-distance algorithm. Reliability of clades was checked with bootstrap analysis with 100 replications.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database under accession numbers indicated that table 3. The other sequences that used for comparison were reached from GenBank and these indicated table 4.

Table 4. Additional sequences used for comparison.

Accession Numbers	References
DQ407519	Brown and others, 2006
EF619998	Lin, 2007
EF619990	Lin, 2007
EF619989	Lin, 2007
EF619982	Lin, 2007
EF205160	Lipatov and others 2007
FM160637	Owoade and others, 2008
EF614305	Turcitu and others, 2006
DQ435201	Yingst and others, 2006

Findings

All viruses were diagnosed as Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) viruses by RT-PCR. Partial-HA gene characterisation of all isolates revealed that the Turkish H5N1 viruses were highly similar to Asian and European H5N1 isolates in all genes from the same time period (Figure 2). The HA cleavage site (PQGERRRKKRGLF and PQGERRRKKRGLF) identified the all H5N1 viruses isolated between 2005 and 2008 (Table 5). WHO recommended primer set were used and this primer set has given us partial Haemagglutinin (HA) gene sequencing (220 bp) of isolates. The Kızıksa Village/Manyas isolate (DQ507519) was used as a referens outgroup for phylogeny (Figure 2). Also sequence of this isolate was same with Romanian isolate (EF614305). 2006, 2007 and 2008 isolates show close relationship with eachother and other European and Asian isolates (Figure 2).

Table 5. Protein structure of HA cleavage site

Years of isolates	Protein structure of HA cleavage site
2005	PQGERRRKKRGLF
2006	PQGERRRKKRGLF
2007	PQEERRRKKRGLF
2008	PQGERRRKKRGLF

Discussion and Conclusion

The present study provides molecular properties of the Turkish HPAI isolates. The information in the present study will be valuable for understanding HPAI isolates from different countries affected by the HPAI outbreak in around Turkey.

Genetic analysis of the all isolates shows that Turkish, European and Asian HPAI H5N1 viruses were highly similar (Figure 2). There was a level of relationship between different outbreaks in Europe, Turkey and Asia. Varying host specificity can be discussed. Turkish HPAI H5N1 virus isolates are almost identical to the virus isolated in wild birds in Central Asia during this time. These data were also confirmed by VLA Weybridge. The European isolates of the Asian HPAI H5N1 type of virus could be classified in closely related clades (BROWN et al., 2006). These clades include virus isolates that have been obtained from various village poultry in Turkey and have clearly been circulating in direct poultry-poultry infections (SABIROVIC et al., 2006). Results suggested that there were direct relation between the affected areas in China (Qinghai lake), in Russia, in southern Siberia (Novosibirsk), in the Europe, in Iraq and in Africa (Figure 2).

This study includes only partial Haemagglutinin (HA) gene sequencing (220 bp) of Turkish isolates. But country needs full HA partial gene sequencing result of the some indicative isolates. This is necassary to prepare epidemiological analyses and to conflict of disease. There are only few isolates that sequenced full HA gene by VLA Weybridge (BROWN et al., 2006) and WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (LIN, 2007). It is important to collect standard core set of data from all outbreaks. Continuing HPAI H5N1 outbreaks in Asia, Europe and the Middle East emphasize the importance of full genetic characterizations of different viruses from different countries and of pathogenesis studies using different animal species.

The questions that remain regarding the Turkish HPAI H5N1 2006 outbreak are where the virus originated and how this virus spread to at least all country. It is possible that wild birds may have played a role in introducing the viruses into different regions of country in 2006. The wide

prevalence of HPAI H5N1 viruses throughout Turkey in 2006 suggests that viruses may have spread to different regions by the introduction of infected wild animals. But It is unknown at present whether HPAI H5N1 infection will persist in wild bird populations throughout the year in the absence of further introductions. For this reason, epidemiological studies are required in Turkey in the areas where infection has been found in wild birds to identify the domestic poultry flocks that could be regarded as at risk.

As a result, this study provides a characterization of recent HPAI H5N1 viruses isolated from Turkey that caused between 2005 and 2008, which has a relationship with HPAI H5N1 outbreak in neighboring countries. To avoid future outbreaks, we need a clear understanding of how this unprecedented epidemic began. Therefore, further characterization of the HPAI H5N1 viruses is urgently needed.

Acknowledgements

This study was requested by The General Directorate of Protection and Control of The Ministry of Agriculture and Rural Affairs. I would like to thank to the Poultry Disease Diagnosis Laboratories of Etlik Central, Bornova İzmir and Pendik İstanbul Veterinary Control and Research Institutes for providing me all samples.

References

1. **Brown I**, (2006). *Incursion of H5N1 'Asian lineage' virus into Europe: source of introduction?*, International Scientific Conference on Avian Influenza and Wild Birds, May 30-31, Rome-Italy.
2. **Brown I, Londt BZ, Shell W, Manvel RJ, Banks J, Gardner R, Outtrim L, Essen SC, Sabirovic M, Slomka, M, Alexander DJ**, (2006). *First incursion of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses of the 'Asia' lineage into Europe*. 6th International Symposium on Avian Influenza, Session 9. Late Breaking Issues, St John's College, April 3-6, Cambridge-UK.
3. **CLC**, (2007). *Genetic characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses, Case Study*, CLC Bio Official Circular, Gustav Wieds Vej 10 8000, October 5, Aarhus C Denmark.
4. **Lin Y**, (2007). WHO Influenza Centre, National Institute for Medical Research, The Ridgeway Mill Hill, London NW7 1AA, UK.
5. **Lipatov AS, EvseenkoVA, Yen HL, Zaykovskaya AV, Durimanov AG, Zolotykh SI, Netesov SV, Drozdov IG, Onishchenko GG, Webster RG and Shestopalov AM**, (2007). *Influenza (H5N1) Viruses in Poultry, Russian Federation, 2005-2006*, Emerging Infect Dis 13, 539-546.
6. **OIE**, (2008). *Avian Influenza*, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.3.4., p.465-481.
7. **Owoade AA, Gerloff NA, Ducatez MF, Taiwo JO, Kremer JR and Muller CP**, (2008). *Replacement of Sublineages of Avian Influenza (H5N1) by Reassortments, Sub-Saharan Africa*, Emerg Infect Dis 14 (11), 1731-1735.
8. **Sabirovic M, Wilesmith J, Hall S, Coulson N, Landeg F**, (2006). *Outbreaks of HPAI H5N1 virus in Europe during 2005/2006 - An overview and commentary*, International Animal Health Division, 1A Page Street, London, SW1P 4PQ, United Kingdom., Defra, Situation Analysis Version 1, Released June 30, pp. 40.
9. **Turcitu MA, Coste HC, Cioranu RP, Nicolae S, Barboi G, Onita I, Neagoe G and Neicut A**, (2006). *HPAI circulating among Romania*, Romania.
10. **Yingst SL, Saad MD and Felt SA**, (2006). *Qinghai-like H5N1 from Domestic Cats*, Northern Iraq Emerging Infect Dis 12 (8), 1295-1297.
11. **WHO**, (2006). *Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) infection*, Weekly epidemiological record, No. 26 (81), 249-260.

Kırıkkale’de endüstri bölgesi civarında toprak, yem, su ve bu yörede yetiştirilen koyunlar ile parazitlerinde bazı ağır metallerin (Cd, Cu, Pb, Zn) belirlenmesi

Atilla BEŞKAYA¹, Kader YILDIZ², Mehmet BAŞALAN³, M. Faruk US¹

¹T.K.B. Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Biyokimya Laboratuvarı, 06020 Etlik/Ankara, ²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 71450 Yahşihan/Kırıkkale, ³Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 71450 Yahşihan/Kırıkkale

Özet: Bu çalışma Kırıkkale’de petrol rafineri ve silah fabrikaları çevresinde yetiştirilen koyunların çeşitli dokularında, bu koyunlarda bulunan parazitte (kist hidatik), yem, su ve toprakta bazı ağır metal düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Endüstri bölgesindeki bitki, toprak ve sudaki kadmiyum düzeyi ortalamaları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Değişik mesafelerden örneklenen yeşil vejetasyonda bakır düzeyleri ortalamaları benzerlik gösterirken bu ortalamanın kuru vejetasyon yemlerinde ve toprakta endüstri bölgesininin 20.km deki mesafede en yüksek seviyede, 5. ve 3. km ise en düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Sudaki bakır düzeyi ise tespit edilebilir sınırların (LoD) altında bulunmuştur. Endüstri bölgesine en yakın olan yerdeki yeşil vejetasyon örneklerinin kurşun düzeyleri diğer örnekleme bölgelerden elde edilenlere kıyasla yaklaşık 2 kat yüksek çıkmış ancak istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir. Toprakta kurşun birikiminin endüstri bölgesinde kontrol örneklerinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Endüstri bölgesindeki vejetasyon örneklerinde çinko düzeyleri benzer bulunmuştur. Ancak endüstri bölgesine en yakın ve en uzak mesafedeki toprak örneklerinde çinko düzeyi orta mesafedekilerden istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Analiz edilen verilere göre kist hidatik ile konak dokuları arasında ağır metal birikimi bakımından Cu, Pb ve Zn’da anlamlı ilişki gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Ağır Metal, Koyun, Helmint, Yem, Su, Toprak.

Determination of some heavy metals (Cd, Cu, Pb, Zn) in breeding sheep tissues with parasitisms, soil, water and feedstuffs of around environment industry in Kırıkkale

Summary: With this project, it was aimed to determine the effects of industrial pollution on sheep tissues, their parasites (cyst hydatic) and their feedstuffs, soil and water samples. No differences were detected in the dry vegetation, soil and water cadmium levels among the locations. Average level of Copper (Cu) in dry vegetation and soil samples collected in the areas 20 km far from industrial region was found to be higher when compared with the samples collected from 5. ve 3. km far from industrial areas. However, Cu level was found to be under detectable limits in the water. Mean lead concentrations of the green vegetation samples collected from the closest location was twice as high as those of samples collected from other areas, however, there was no significant difference. It was determined that accumulation of lead in soils collected from 3 consecutive areas close by the plants were significantly higher than that of control area (p<0,05). Zinc concentrations in vegetation samples in industrialized area were similar. In contrast, zinc levels of soil samples in the closest and farthest area were significantly higher than those in the middle (p<0,05). In response to the analysed data, it was determined that Cu, Pb and Zn concentrations in tissue and cyst hydatic were significantly related.

Key words: Heavy Metal, Sheep, Helmint, Feed, Water, Soil.

Giriş

Çevrenin hava, su ve toprak gibi unsurları üzerinde ortaya çıkan ve canlı öğelerin hayati aktivitelerini olumsuz yönde etkileyen sorunlar çevre kirliliği adıyla değerlendirilmektedir. Çevre sorunlarının başlıca kaynakları arasında hava kirliliği, gübre ve zirai mücadelede kullanılan ilaçlar, endüstriyel atıklar, çöp, doğal bitki örtüsünün ve ormanların tahribi bulunmaktadır. Toprak kirliliğinin çevre sağlığı açısından en önemli etkisi, topraktaki kirleticilerin

bitki bünyesine geçerek bunu ya doğrudan ya da bu bitkilerle beslenen hayvanların besin olarak tüketilmesi sonucu insan bünyesine geçmesidir.

Ağır metal, yoğunluğu 5 g/cm³’ten yüksek olan veya atom ağırlığı 50 ve daha büyük olan elementlere denir. Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Se, Co Ni, Fl ve I gibi elementler bitki ve hayvanlar için gerekli mikro besin öğeleri veya iz elementleri olarak adlandırılmaktadır. Mineraller insan ve hayvanlar tarafından

yüksek düzeylerde alınması zehirlenmeye neden olmaktadır.

Bu metallerin vücuda alınmasında yenilen gıdanın hangi çevre, toprak ve suda yetiştiği önem taşımaktadır. Endüstriyel kirliliğin ve trafiğin yoğun olduğu topraklarda yetişen bitkisel ürünlerde ve yemlerle beslenen hayvanların karaciğer, böbrek ve beyin gibi biyolojik doku ve vücut sıvılarında birikmesi sonucunda doku hasarı ve hatta ölümler meydana gelmektedir (KARAGÜL ve ark., 2000; ERGÜN, 2001).

Bakır başta karaciğer olmak üzere kalp, böbrek, beyin ve kılırlarda depolanır. Ulusal Bilimler Akademisi verilerine göre toksik düzeyler atlar için 800 ppm, tavuklar için 300 ppm, domuzlar için 250 ppm, sığırlar için 100 ppm ve koyunlar için de 25 ppm'dir. Ayrıca bakır ve çinko insan ve hayvanların yaşamsal fonksiyonları için dışarıdan alınması zorunlu mikro elementler olup, yüksek oranda alındıkları takdirde ise (karaciğerde Cu 700 ppm, Zn bitkilerde 400 ppm, hayvanlarda 500-1000 ppm ve Fe ise 1000 ppm üzerine çıkması halinde) zararlı etkilere sebep olan inorganik bileşikler olarak değerlendirilmiştir (KARAGÜL ve ark., 2000; ERGÜN, 2001).

Yapılan araştırmalarda; uzun süreli maruziyete kalan böbrekte biriken kadmiyum konsantrasyonu (wet wght.) 200 mg/kg'a ulaşması durumunda, böbrek fonksiyonlarında bozulma olduğu tespit edilmiş ve böbrekte oluşan hasarın düzelmediği bildirilmiştir (ERGÜN, 2001).

Halk sağlığı açısından bir ergin insanın diyetle alabileceği haftalık maksimum Cd miktarı 400-500 mikro gram iken, WHO, canlı ağırlık üzerinden günlük maksimum 1,0 ppb düzeyinde alınabileceğini bildirmiştir. Cu yüzeysel sularında 0,01-0,5 ppm bulunurken, WHO alınması önerilen maksimum miktarı 1,0 ppm olarak bildirmektedir (SURES, 2001; KALAY ve ark., 2004).

Kurşun yer kabuğunda 12.5 g/t miktar sıklığı ile bulunan ve petrolden elde edilen tetraetil (CH₃CH₂)₄Pb) eklenerek oktan sayısı artırılan yakıtlarla yanmalı motorlardan çıkan gazlarla dünya atmosferine boşaltılarak, hava kirliliğine neden olmaktadır (MORGAN, 1994). Petrol bileşiklerindeki toksik maddelerin başlıcalarının C4-C12 alifatik ve aromatik hidrokarbonlar, naftalin, parafin ve alkalenlerin yanı sıra tetraetil kurşun olduğu ve bu-

nunda karaciğerdeki yarı ömrünün 3-5 gün olan trietil kurşuna dönüştüğü bildirilmiştir. Trietil kurşunun yarı ömrü beyin dokusunda 500 güne çıkabileceği ve nörotoksik olduğu yine aynı makalede belirtilmiştir. Kentsel alanlarda yaşayan insanlarda kan serumu kurşun konsantrasyonunun 0.1 µg/ml olduğu, diğer insanlarda 0.04-0.06 µg/ml olduğu bildirilmiştir (CAIRNEY ve ark., 2002).

Pil fabrikası atık sularında 5,66 mg/L, asidik maden drenajlarında 0,02-2,5 mg/L, tetraetil kurşun üreten fabrika atık sularında 125-150 mg/L organik, 66-85 mg/L inorganik kurşun kirliliğine rastlanmıştır. Gıdaların önde gelen gelen metalik kirleticilerinden biri kurşun olup, sağlıklı erişkin bir kişinin kirli çevre nedeniyle besinlerle günde 70 mikrogram civarında kurşun aldıkları bildirilmiştir (SURES ve ark., 2000; CAIRNEY ve ark., 2002).

Kurşun için 1999'da WHO'nun verdiği maksimum değer içilen sularında 50 µg/L olarak bildirilirken, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın (2003)'te 15 µg/L limit değerinin aşılmasını önermesi üzerine nisan 2003'te Japonya 20 µg/L AB ve ülkemizde 2005'te TS-266 standardı ile içme sularında kurşun limitini 10 µg/L (ppb)'ye indirmiştir.

Çinkonun çeşme sularında 0,01-1,0 ppm düzeyinde olup, yer üstü sularında WHO izin verdiği üst değer ise 5,0 ppm'dir. Çinko yer kabuğunda yaklaşık 70-130 ppm arasında bulunurken; normal toprak 50 ppm Zn içerir. Çinko değerleri kuru madde bazında kaba yem maddelerinde 17-160 ppm, tahıl danelerinde 20-30 ppm, yağlı tohum küspelerinde 50-70 ppm ve hayvansal protein kaynaklarında 90-100 ppm arasındadır. Memeli dokuların çoğunda Zn konsantrasyonu türlere göre 30-250 mg/g arasında değişir (GEORGIEVSKI, 1982; WHO, 1994; NRC, 2001). Değişik bitki türlerine göre saman ve slajlarda 60 ppm, tahıl danelerinde 20-30 ppm, soya, susam, pamuk tohumu gibi bitkisel proteinlerde 50-70 ppm arasında değişir. Zn geniş bir güvenlik sınırına sahip olduğu için kısmen toksik olmayan bir element olarak kabul edilir. Yem Zn içeriğinin 40 ppm den düşük olması yetersizlik yönünden önemli bir indikatör olarak kabul edilir (GEORGIEVSKI, 1982).

Son yıllarda endüstrileşme ve hızlı nüfus artışına bağlı olarak sucul ortamda hızla artan ağır metal seviyesi burada yaşayan canlılar üzerine toksik etkiye neden olmuştur. Suda yaşayan canlılar doğal

ortamlarında düşük yoğunluklardaki toksik maddelere bile uzun süre maruz kalmaktadır. Ayrıca yoğunluğu artan ağır metaller besin zinciri aracılığı ile diğer canlılara taşınmaktadır (SURES, 2001).

Parazitler buldukları konak için zararlı canlılar olarak kabul edilirler (SYMTH, 1994). Ancak bazı helmintlerin içinde yaşadıkları konaklarının dokularına çevreden alınan ağır metallerin birikmesine engel olduğu belirlenmiştir (SURES and SIDDALL, 1999). Özellikle sucul ortamda ağır metal kirliliğinin bu yolla izlenebileceği ileri sürülmüştür (Sures, 2001). Sucul habitatta metal yoğunluğunun izlenmesinde balık parazitlerinin potansiyel rolü hakkında bilgi bulunmakla birlikte karada yaşayan çiftlik hayvanlarındaki parazitlerin çevre kirliliğinin izlenmesindeki rolü hakkında oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır (BARUS et al., 2000; SURES et al., 2000a, b).

Bu çalışma ile Kırıkkale ilinde mevcut silah fabrikaları ve mühimmat yan sanayi ile petrol rafinerisinin meydana getirdiği endüstriyel kirliliğinin kaynağı sayılan ağır metallerin, bu yörede yetiştirilen hayvanlarda ve hayvan yemi olarak kullanılan bitki örtüsü, su ve toprağın üzerine etkileri ile yörede yetiştirilen koyunların çeşitli dokularındaki ağır metal birikim düzeylerine ve parazitlerin birikimdeki rolü üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma Mart 2006 - Şubat 2007 tarihleri arasında Kırıkkale'de petrol rafinerisi ile silah ve mühimmat fabrikaları civarında yetiştirilen 20 adet koyun ile adı geçen endüstri bölgesi yakınında yetiştirilen kaba hayvan yemleri (yeşil ve kuru) üzerinde yürütülmüştür. Bu amaçla bölgede yetiştirilen koyunların kesimi takiben 10'unun karaciğer, bağırsak, böbrek, akciğer ve larvaların germinal membranlarından örnekler alınmış, organları parazit yönünden muayene edilmiştir. Kontrol bölgesinde yetişen koyunlara (n:10) ait doku örnekleri de alınmıştır. Aynı yörede yetiştirilen hayvanların tükettiği mera bitkilerinde çalışma süresince endüstri bölgesinin 0.5, 3.0, 5.0 ve 20 km uzağından toprak yüzeyinin 1 cm yukarısından kesilerek örnekler her ay toplanmıştır. Endüstri bölgesinin 20 km uzağı kontrol olarak belirlenmiştir. Bu bölgeden de aynı şekilde toprak (n=48), yeşil ve kuru hayvan kaba yemleri (n=48) ayrıca sudan da (n=36) deneme grubu ile eş zamanlı olarak örnekler alınmıştır. Aynı zamanda Kızılırmak nehri hem yörede yetiştirilen hayvanla-

rın içme suyu kaynağı olması bakımından hem de hayvan yemi hammaddelerinin üretildiği arazilerin sulanmasında kullanılması bakımından değerlendirilmiş ve nehrin endüstri bölgesine 3.0, 5.0 ve 20 km mesafelerine yakın yüzeyinden su örnekleri alınmıştır.

Her bir numune mikro dalga fırınında yakma işlemlerinden geçirildikten sonra Atomik Absorbsiyon Spektrometre ile Flame tekniği (FAAS) kullanılarak Zn ve Cu, Graphite fırın tekniği (GFAAS) ile de Pb ve Cd düzeyleri belirlenmiştir (A.O.A.C., 1990; JORHEM, 1993; ANON, 2000; FOOD QUALITY SERVICES, 2002; TGKY, 2005b).

Endüstri bölgesinden toplanan her bir örnek grubu blok deneme desenine oturtulmuş ve incelenen metal konsantrasyonları her bir örnek grubunda endüstri bölgesine olan uzaklığa karşı regresyona tabi tutulmuştur. Genel düzlemsel modelde örnek grubu ile mesafe interaksyonunun anlamlı ($p<0.05$) olduğu durumlarda ikili karşılaştırmalar, en az anlamlı farklar ile yapılmış ve istatistiki anlamlılık ($p<0.05$) olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışmada toplanılan örneklere ait veriler tablolar halinde aşağıda sunulmuştur. Örneklerin kadmiyum düzeyi ortalamaları her bir örnek grubunda mesafeler arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 1). Ancak kontrol grubu olarak seçilen bölgeden temin edilen yeşil vejetasyon örneklerinin kadmiyum düzeyi ortalaması endüstri bölgesine yakın bölgeden temin edilenlerinkinden yaklaşık 4 kat daha düşük bulunmuştur (15,3 µg/kg). Kuru vejetasyon, toprak ve suda ise mesafeler arasında fark bulunmamıştır.

Tablo 1. Endüstri Bölgesindeki Bitkilerde, Toprak ve Sudaki Kadmiyum Düzeyleri (µg/kg).

Örnek Grubu	Endüstri bölgesine uzaklık (km)			
	0,5	3	5	20
Yeşil Vejetasyon	61,2 ^b	51,6 ^b	66,6 ^b	15,3 ^a
Kuru Vejetasyon	44,1	60,9	58,8	57,6
Toprak	113,61	103,32	121,61	129,61
Su	X	164,65	228,31	183,32

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan mesafeler arasındaki fark önemlidir ($p<0.001$).

Tablo 2.'de örneklerin bakır düzeyleri ortalamalarının yeşil vejetasyonda değişik mesafelerde benzerlik

gösterdiği; ancak kuru vejetasyon yemlerinde ve toprakta endüstri bölgesinin 20.km deki mesafede Cu düzeyi en yüksek seviyede, 5. ve 3. km ise en düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Sudaki bakır düzeyi ise tespit edilebilir sınırların (LoD) altında bulunmuştur.

Tablo 2. Endüstri Bölgesindeki Bitkilerde, Toprak ve Sudaki Bakır Düzeyleri (mg/kg).

Örnek Grubu	Endüstri bölgesine uzaklık (km)			
	0,5	3	5	20
Yeşil Vejetasyon	4,8	5,7	6,6	4,8
Kuru Vejetasyon	3,9 ^b	4,2 ^b	1,8 ^b	25,8 ^a
Toprak	20,86 ^b	13,43 ^b	17,29 ^b	33,58 ^a
Su	X	X	X	X

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan mesafeler arasındaki fark önemlidir (p<0.001).

Endüstri bölgesine en yakın olan yerden toplanan yeşil vejetasyon örneklerinin kurşun düzeyleri diğer bölgelerden elde edilenlere kıyasla yaklaşık 2 kat yüksek çıkmış ve istatistik olarak fark tespit edilmemiştir (Tablo 3). Kuru vejetasyon ise 3 km mesafede diğer bölgelerden elde edilenlerden sayısal olarak yüksek çıkmıştır. Toprakta kurşun birikimi endüstri bölgesine yakın üç bölgede kontrol örneklerinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).

Tablo 3. Endüstri Bölgesindeki Bitkilerde, Toprak ve Sudaki Kurşun Düzeyleri (µg/kg).

Örnek Grubu	Endüstri bölgesine uzaklık (km)			
	0,5	3	5	20
Yeşil Vejetasyon	1408,2 ^a	750 ^b	713,4 ^b	785,4 ^b
Kuru Vejetasyon	1378,2	1805,7	1417,8	1470,9
Toprak	2501,04 ^a	2161,79 ^a	2778,12 ^a	1785,82 ^b
Su	X	141,32	158,98	137,65

Tablo 5. Endüstri Bölgesinde Kesilen Koyun Dokuları ile Kist Hidatik Ağır Metal Düzeyleri.

Biyokimyasal Parametreler	Parazit		Dokular			
	Enfeksiyon	Kist hidatik	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Bağırsak
Cd (µg/kg)	+	28,8 ^c	3406,8 ^a	23,1 ^c	547,8 ^b	18,9 ^c
	-	0,0	130,8 ^a	37,5 ^b	274,5 ^a	9,0 ^c
Cu (mg/kg)	+	42,9 ^b	123 ^a	7,2 ^b	12,3 ^b	1,5 ^b
	-	0,0	186 ^a	9,3 ^b	18,6 ^b	1,8 ^c
Pb (µg/kg)	+	316,5 ^a	255,9 ^a	75,3 ^b	370,2 ^a	41,4 ^b
	-	0,0	90 ^b	43,2 ^c	187,8 ^a	107,1 ^b
Zn (mg/kg)	+	94,5 ^a	105,6 ^a	63,6 ^b	89,4 ^{ab}	63 ^b
	-	0,0	101,1 ^{ab}	83,1 ^b	106,8 ^a	54,3 ^c
n	10/10	20	20	20	20	20

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan parazit ve hayvan dokuları arasındaki fark önemlidir (p<0.001).

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan mesafeler arasındaki fark önemlidir (p<0.001).

Endüstri bölgesindeki bitkilerde, toprak ve sudaki çinko düzeyleri Tablo 4'te görülmektedir. Vejetasyon örneklerinde çinko düzeyleri benzer bulunmuştur. Ancak endüstri bölgesine en yakın ve en uzak mesafedeki toprak örneklerinde çinko düzeyi orta mesafedekilerden istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 4. Endüstri Bölgesindeki Bitkilerde, Toprak ve Sudaki Çinko Düzeyleri (mg/kg).

Örnek Grubu	Endüstri bölgesine uzaklık (km)			
	0,5	3	5	20
Yeşil Vejetasyon	39,0	39,9	47,1	34,2
Kuru Vejetasyon	22,5	24,0	31,2	25,2
Toprak	41,58 ^a	32,58 ^b	36,87 ^b	54,30 ^a
Su	X	2,67	3,67	2,00

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan mesafeler arasındaki fark önemlidir (p<0.001).

Bölgede yetiştirilen koyunlarda parazit olarak karaciğer ve akciğerlerinde kist hidatik'e rastlanmıştır. Çapı 3 cm'den büyük olan kistlerin germinal membranları analiz edilmiştir. Kist hidatik ile konak dokularında Cu, Pb ve Zn birikimi bakımından anlamlı ilişki gözlenmiştir. Parazitle enfekte koyunların akciğer, böbrek ve bağırsakları ile bu hayvanlarda bulunan kist hidatik'lerde Cu birikiminin benzer olduğu, fakat koyun karaciğerindeki bakır birikiminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.001). Kurşunun koyun karaciğeri, böbreği ve kist hidatik'te daha yüksek oranda biriktiği belirlenmiştir (p<0.001). Çinkonun koyunların karaciğer ve kist hidatik'inde akciğer ve bağırsağa göre daha fazla biriktiği saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Hayvan yetiştiriciliği ekonomik hayatı yakından etkileyen, insanların günlük yaşantısının her safhasında yeri olan geniş bir faaliyet alanıdır. Farklı yollarla doğaya salınan ağır metaller ve çeşitli kimyasallar çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Bu kirliliğin canlı hayatı tehdit ettiği görülmektedir. Polislerin silah eğitimi yaptıkları yerdeki yüksek Pb düzeyinin civarda yaşayan yabani hayvanlarda kitlesel ölüme sebep olduğu belirlenmiştir (LEVIS et al., 2001).

Boston ve Ontario'da Veteriner Tanı Laboratuvarı verileri incelendiğinde ağır metal toksisitesi verilerinin yıllara, türlere ve coğrafi bölgelere göre dağılımında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (HOFF et al., 1998; MORGAN, 1994). Çevredeki ağır metallerin besin zinciri aracılığı ile insan ve hayvan dokularında biriktiği bilinmektedir. Dwivedi et al. (2001), çinko madeni işletmelerinin yakınında yaşayan sığır ve mandaların çeşitli dokularında kurşun ve kadmiyum düzeylerinin yüksek olduğunu bildirmiştir.

Kazakistan'da maden işleme tesislerinin bulunduğu bölgedeki sığır, koyun ve at etlerinde yüksek oranda ağır metal birikimi belirlenmiştir (FARMER and FARMER, 2000). Bu çalışmada ise Kırıkkale'de endüstri bölgesinde yetiştirilen koyunların karaciğer, akciğer, böbrek ve bağırsaklarında Cu, Pb ve Zn birikiminin kontrol bölgesinde yaşayan konyunlara göre anlamlı farkta olduğu gözlenmiştir.

Kazakistan'ın maden işleme tesislerinin bulunduğu bölgedeki mera otlarının da toksik metallerle kirlendiği belirlenmiştir (FARMER and FARMER, 2000). Endüstriyel bölgeye yakın bir çiftlikte bulunan sığır sürüsünde fertilitite oranının %90 dan % 42 ye düşmesine, ayrıca aynı sürüde ölümlere sebep olan hastalığın etiolojisinde endüstri bölgesinden yayılan Cu, Zn ve Pb nin etkili olduğu ortaya konulmuştur (PARADA et al., 1987).

Bu çalışmada Kırıkkale'de endüstri bölgesi civarındaki bitki, toprak ve suda kadmiyum düzeyi ortalamalarında anlamlı bir fark bulunamamış, ancak kontrol grubunda yeşil vejetasyon örneklerinde endüstri bölgesindeki örneklere kıyasla yaklaşık 4 kat daha düşük bulunmuştur.

Analiz edilen örneklerin bakır düzeyleri ortalamalarının benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Endüstri bölgesine en yakın olan yerden toplanan yeşil vejetasyon örneklerinin kurşun düzeyleri diğer bölgelerden elde edilenlere kıyasla yaklaşık 2 kat yüksek çıkmış ve istatistik olarak fark tespit edilmiştir. Toprakta kurşun birikiminin endüstri bölgesinde kontrol örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

TKB'nin Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliğine (2005), göre yeşil otlarda en fazla bulunması gereken kurşun düzeyleri 40 mg/kg kadmiyum ise bitkisel yemlerde 1 mg/kg olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada elde edilen değerler önerilen rakamlardan daha düşük düzeydedir.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine (2005a), göre sığır, koyun, domuz ve kanatlıların yenilebilir sakatatlarında maksimum kurşun limiti 0.5 mg/kg, kadmiyum limiti ise aynı canlıların karaciğerinde 0.5 mg/kg, böbreğinde 1.0 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada analiz edilen endüstri bölgesinde yetiştirilmiş koyunların karaciğer, akciğer ve böbrek ve bağırsaklarında kadmiyum düzeyi sırasıyla 3406.8, 23.1 ve 547.8, 18.9 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Kurşun düzeyi ise aynı dokularda sırasıyla 255.9, 75.3, 370.2 ve 41.4 µg/kg düzeyinde belirlenmiştir. Koyunların yenilebilir sakatatında bulunan her iki ağır metal düzeyinin yönetmelikte belirlenen maksimum limitlerden yüksek olduğu gözlenmiştir.

Türk Gıda Kodeksi verilerine göre Cd, Pb, Cu ve Zn için içme suyundaki tolerans değerleri sırasıyla 0.005 mg/kg, 0.01 mg/kg, 1.5 mg/kg ve 5.0 mg/kg'dır. Bu çalışmada örneklenen Kızılırmak suyunda bakır düzeyi tespit edilebilir seviyeden düşük çıkmıştır. Kadmiyum düzeyi ise endüstri bölgesine 3, 5 ve 20 km mesafede sırasıyla 164.65, 228.31 ve 183.32 µg/kg düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Kurşun düzeyi ise örneklenen 3 mesafede de birbirine yakın 141.32, 158.98 ve 137.65 µg/kg olduğu gözlenmiştir. Sudaki çinko düzeyinin ise oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Böylece örnekleme yapılan Kızılırmak suyunun Cd ve Pb bakımından ağır metal düzeyleri TGK Tebliği tolerans verileri ile Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğinin "I., II., III. ve IV. su kalite sınıfları"nın tasnifi üstünde olduğu tespit edilmiş, ancak Cu ve Zn bakımından ise çok yüksek olmadığı belirlenmiştir.

Böbrek ve bağırsağın memeli canlılarda metal alınımı ve birikimi ile ilgili önemli organlar olduğu

bildirilmektedir (KARAGÜL ve ark., 2000). Bağırsak kurşun için alım yeridir, böbrek ise kadmiyum birikimi ve atılması için önemli bir organdır. Bu çalışmada karaciğerde ve böbrekte Cd ve Pb düzeyinin en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Zn ve Cu'nun en yoğun düzeyde tespit edildiği organ ise karaciğer olmuştur.

Kist hidatik, Taeniidae ailesine bağlı *Echinococcus granulosus*'un larva formudur. Parazitin son konağı köpek, arakonakları ise koyun keçi, sığır, deve, at ve kemirgenler gibi çeşitli hayvanlar ile insan olmaktadır (SYMTH, 1994). Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere tüm dünyada bu parazit hem köpeklerde hem de arakonak canlılarda yaygın zoonoz parazittir (ROMIG et al., 2006). Türkiye'de çiftlik hayvanlarında bu parazit larvasının yaygın olduğu bilinmektedir (ÖGE ve ark., 1998; GICIK ve ark., 2002). Kırıkkale'de daha önceki çalışmalarda hastalık koyun ve sığırlarda tespit edilmiştir (YILDIZ and GÜRCAN, 2003; YILDIZ ve TUNCER, 2005). Bu çalışmada Kırıkkale'de endüstri bölgesinden örneklenen koyunların karaciğer ve akciğerlerinde kist hidatik görülmüş ve bu parazit larvasının germinal membranı analiz edilmiştir.

Hızlı endüstrileşmenin deniz kıyılarında olmasıyla denizlerdeki köpek balıklarında civa birikiminin tehlikeli boyutlara ulaştığı (STORELLI et al., 2002) bildirilmiştir. Sucul ortamdaki ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde pek çok balık-parazit modeli kullanılmaktadır (SURES et al., 1994; SURES et al., 1999). Bu konu ile ilgili memeli hayvanlarda yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. İtalya'da, yerleşim birimlerine yakın bölgelerdeki metal depolarında yakalanan yabani ratlardaki kurşun birikimi çevre kontaminasyonu için bir indikatör olarak kullanılabilirliği ileri sürülmüştür (CERUTI et al., 2002). Domuzlarda yaşayan bir parazit olan *Macroacanthorhynchus hirudinaceus*'ta domuzun kasları, karaciğeri, böbreği ve bağırsağına göre daha yüksek Pb bulunduğunu gözlenmiş, parazitteki Cd konsantrasyonunun ise böbreğe kıyasla 5, karaciğere kıyasla ise 32 kez daha yüksek olduğu bildirilmiştir (SURES et al., 2000a). Ayrıca araştırmacılar *Ligula intestinalis* ve *Mesocostoides perlatius* gibi parazitlerle enfekte çeşitli kuş türlerinin kas ve karaciğerlerindeki Pb ve Cd yoğunluğunu kıyasladıklarında belirgin farklılık gözlemlemişlerdir (BARUS et al., 2000). Deneysel çalışmalarda *Moniliformis moniliformis* ile enfekte

edilmiş ratlara ağızdan kurşun verilmiş, enfekte ratların dışkılarındaki kurşunun enfekte olmayanlara göre daha düşük miktarda bulunduğu kaydedilmiştir. Kurşun, parazitte konağın karaciğer, bağırsak, böbrek renal korteks ve medullasıyla kıyasla daha yüksek düzeyde saptanmıştır (SURES et al., 2000b). Bu çalışmada koyunların çeşitli organlarında yerleşen kist hidatik'teki ağır metal birikimi araştırılmıştır. Analiz edilen parazit örneklerinde tespit edilen Cd, Pb, Cu ve Zn düzeyleri konaklarının dokularındaki metal düzeyi ile kıyaslandığında literatürde bildirilen gibi yüksek oranda birikime rastlanmamıştır.

Toksik metal bağlama yeteneği olan mikroorganizmalar, algler, mantarlar ve bitkisel biyomasslar denenmiş ve ekonomik olmamalarına rağmen faydalı bulunmuşlardır (SCHNEEGURT et al., 2001). Deneysel çalışmalarda parazitlerle enfekte ve enfekte olmayan balıklara kurşun verilmiş, yapılan otopsi sonucunda balıkların bağırsak duvarında saptanan kurşun miktarının kontrol grubu balıklarda enfekte balıklara göre iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (SURES ve SIDDALL, 1999).

Sonuç olarak bu çalışmada, petrol rafineri ve silah fabrikaları ile yan sanayisinin bulunduğu endüstri yöresinden en uzak mesafede (20.km) yetiştirilen yeşil bitki örnek grubunda Cd değeri en düşük, toprak ve kuru bitki örneklerinde ise Cu değeri en yüksek bulunmuştur. Pb miktarı, toprak örneklerinde en yakın mesafede (0,5.km) en düşük seviyede, yeşil bitki örneklerinde ise en yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Su örneklerinde ise Cu tespit edilebilir limitin altında, Zn ise tolerans edilebilir limitlerin altında, Cd ve Pb değerleri TGK, AB, ABD ve WHO standartların referans değerlerinin üstünde olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca bir sestod larvası olan kist hidatik'in koyun dokularına ağır metal birikimine etkileri araştırılmış, sucul ortamda bildirilen anlamlı ilişki koyun paraziti (kist hidatik) ve dokuları arasında gözlenmemiştir. Bu çalışmada kist hidatik'in analiz edilen metallere bağlı çevre kirliliğinin izlenmesinde uygun bir parazit modeli olmadığı anlaşılmıştır. Sonuçlar ışığında bölgenin kirlilik açısından sürekli gözlem altında tutulması yetiştiricilik ve halk sağlığı bakımından uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. **A.O.A.C.**, (1990). *Official Methods of Analysis "Minerals in Feeds by Atomic Absorption Spectrophotometry-Official Final Action"*. Association of Official Analytical Chemists, p.1298, Virginia, D.C.
2. **Anon**, (2000). Perkin-Elmer International Instruments Chemical Analytical Methods For FAAS/GFAAS In Handbook Laboratory.
3. **Barus V, Tenora F, Kracmar S**, (2000). *Heavy metal (Pb,Cd) concentrations in adult tapeworms (Cestoda) parasitizing birds (Aves)*. Helminthologia, 37, 131-136.
4. **Ceruti R, Ghisleni G, Ferreti E, Commarato S, Sonzogni O, Scranzoni E**, (2002). *Wild rats as monitors of environmental lead contamination in the urban area of Milan, Italy*. Environ Poll, 117, 255-259.
5. **Dwivedi SK, Swarup D, Dey S, Patra RC**, (2001). *Lead poisoning in cattle and buffalo near primarily lead-zinc smelter in India*. Vet Hum Toxicol, 43, 93-94.
6. **Farmer AA, Farmer AM**, (2000). *Concentrations of cadmium, lead and zinc in livestock feed and organs around a metal production centre in Eastern Kazakstan*. Sci Total Environ, 257, 53-60.
7. **Food Quality Services** (2002). *Trace Element Analysis is a Regulatory Requirement for All Food Companies under EC Directive*. EC 2002/466.
8. **Gıcık Y, Arslan MO, Kara M, Köse M**, (2004). *Kars ilinde kesilen sığır ve koyunlarda kistik ekinokokkozisin yaygınlığı*. Türkiye Parazit Derg, 28, 136-139.
9. **Hoff B, Boermans HJ, Baird JD**, (1998). *Retrospective study (1990-1995) of toxic metal analyses requested at a veterinary diagnostic toxicology laboratory in Ontario*. Can Vet J, 39, 39-43.
10. **Jorhem L**, (1993). *Determination of metals in foodstuffs by atomic absorption spectrophotometry after dry ashing: NMKL Interlaboratory study of lead, cadmium, zinc, copper, iron, chromium, and nickel*. J AOAC Int, 76, 798.
11. **Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T**. (2000). Klinik Biyokimya, Medisan Yayın Serisi, 45: Ankara.
12. **Lewis LA, Poppanga RJ, Davidson WR, Fischer JR, Morgan KA**, (2001). *Lead toxicosis and trace element levels in wild bird and mammals at a firearm training facility*. Arch Environ Contam Toxicol, 41, 208-214.
13. **Morgan RV**, (1994). *Lead poisoning in small companion animals: an update*. Vet Hum Toxicol, 36, 18-22.
14. **Öge H, Kalınbacak F, Gıcık Y, Yıldız K**, (1998). *Ankara yöresinde kesilen koyun, keçi ve sığırlarda bazı metasetodların (Hidatid kist, Cysticercus tenuicollis, Cysticercus bovis) yayılışı*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 45, 123-130.
15. **Parada R, Gonzales S, Bergquist E**, (1987). *Industrial pollution with copper and other heavy metals in a beef cattle ranch*. Vet Hum Toxicol, 29, 122-126.
16. **Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U**, (2006). *The present situation of echinococcosis in Europe*. Parasitol Int, 55, 187-191.
17. **Schneegurt MA, Jain JC, Menicucci JA, Brown SA, Kemner KM, Garofalo DF, Quallick MR, Neal CR, Kulpa CF**, (2001). *Biomass byproducts for the remediation of wastewaters contaminated with toxic metals*. Environ Sci Tech, 35, 3786-3791.
18. **Storelli MM, Giacomini-Stuffler R, Marcotrigiano G**, (2002). *Mercury accumulation and speciation in muscle tissue of different species of sharks from Mediterranean Sea, Italy*. Bull Environ Contam Toxicol, 68, 201-210.
19. **Sures B**, (2001). *The use of fish parasites as bioindicators of heavy metals in aquatic ecosystems: a review*. Aquat Ecol, 35, 245-255.
20. **Sures B, Franken M, Taraschewski H**, (2000a). *Element concentrations in Archiacanthocephalan Macrocanthorhynchus hirudinaceus compared with those in the porcine definitive host from a slaughterhouse in La Paz, Bolivia*. Int J Parasitol, 30, 1071-1076.
21. **Sures B, Jürges G, Taraschewski H**, (2000b). *Accumulation and distribution of lead in the Archiacanthocephalan Moniliformis moniliformis from experimentally infected rats*. Parasitology, 121, 427-433.
22. **Sures B, Siddall R**, (1999). *Pomphorhynchus laevis: The intestinal Acanthocephalan as a lead sink for its fish host, chub (Leuciscus cephalus)*. Exp Parasitol, 93, 66-72.
23. **Sures B, Siddall R, Taraschewski H**, (1999). *Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution*. Parasitol Today, 15, 16-21.
24. **Sures B, Taraschewski H, Jackwert E**, (1994). *Lead accumulation in Pomphorhynchus laevis and its host*. J Parasitol, 80, 355-357.
25. **Symth DJ**, (1994). *Introduction to Animal Parasitology*. Cambridge University Press.
26. **TGKY (2005a)**. *Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ No.:2002/63*.
27. **TGKY (2005b)**. *Ağır Metal (Cd, Pb) Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği 2005/35*.
28. **Yıldız K, Gürcan S**, (2003). *Prevalence of hydatidosis and fertility of hydatid cysts in sheep in Kırıkkale, Turkey*. Acta Vet Hung, 51, 181-187.
29. **Yıldız K, Tuncer C**, (2005). *Kırıkkale'de sığırlarda kist hidatik'in yayılışı*. Türkiye Parazit Derg, 29, 247-250.
30. **Ergün A**, (2001). *Mineral elementler*. In, Ergün A, Tuncer DŞ (Ed): Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Medipress, 77-91, Ankara.
31. **http://www.who.int/water_sanitation_health/dvq/guidelines/en**. *Dünya Sağlık Örgütü İçilecek Su Kalitesi Rehberi*; WHO Guidelines for drinking-water quality.

32. **Cairney S, Maruff P, Burns C, Currie B**, (2002). *The Neurobehavioural Consequences Of Petrol Gasoline Sniffing*. Neuroscience Biobehavior Review, 26, 81-85.
33. **Georgevski VI**, (1982). *The physiological role of microelements; Zinc Mineral Nutrition of Animals*; pp:192-198.
34. **Kalay M, Koyuncu CE, Dönmez AE**, (2004). *Comparison of Cd levels in the muscle and liver tissues of Mullus barbatus and Sparus aurata caught from the Mersin Gulf. (in Turkish)*. Ekoloji Dergisi. 13(52):23-27.

Dichlorvos'un ratların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve E'nin koruyucu rolü

Ayşenur ÇETİN¹, Yavuz ULUSOY², Ayşe ÖĞÜTCÜ¹, Fatma Gökçe UZUN¹, Filiz DEMİR¹

¹Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak., Biyoloji AD, Ankara, ²Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Patoloji Lab. Ankara

Özet: Organofosforlu bir pestisit olan dichlorvos zirai zararlıların kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada vitamin C (200mg/kg)+vitamin E (200mg/kg), dichlorvos (1,6mg/kg) ve vitamin C (200mg/kg)+vitamin E (200mg/kg)+dichlorvos erkek ratlara oral olarak 7 hafta süre ile uygulandı. Muameleden 24 saat, 4 hafta ve 7 hafta sonra ratların ince bağırsak dokularındaki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu kullanılarak, kontrol grubu ile mukayeseli olarak incelendi. Dichlorvos uygulandıktan 4 ve 7 hafta sonra ince bağırsakta villuslarda kısalma ve genişleme tespit edildi. Vitamin C+vitamin E+dichlorvos uygulanan ratların ince bağırsak dokularında da benzer patolojik değişiklikler gözlemlendi.

Sonuç olarak düşük doz dichlorvos ratların ince bağırsak dokularında patolojik değişikliklerin oluşmasına yol açmaktadır. Vitamin C ve vitamin E'nin, dichlorvosun ince bağırsak dokusunda meydana getirdiği patolojik değişiklikleri önleyemediği tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Dichlorvos, pestisit; histopatoloji, ince bağırsak, vitamin C, vitamin E.

Effects of dichlorvos in small intestine tissue of rats and protective role of vitamins C and E

Summary: Dichlorvos, an organophosphorus pesticide, is widely used in agricultural control. In the present study, vitamin C (200mg/kg)+vitamin E (200mg/kg), dichlorvos (1,6mg/kg) and vitamin C (200mg/kg)+vitamin E (200mg/kg)+dichlorvos were given to male rats orally for 7 weeks. Histopathological changes in the small intestine tissues were investigated using light microscope at the end of 24h, 4th and 7th weeks comparatively with control group. After 4 and 7 weeks of dichlorvos exposure shortening and dilatation were observed in intestinal villi. Same histopathological changes in the small intestine tissues were observed at the end of 24h, 4th and 7th weeks.

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

Key words: Dichlorvos, pesticides, histopathology, small intestine, vitamin C, vitamin E.

Giriş

Organofosforlu (OP) bileşikler tarım zararlılarının ve hastalık yapıcı vektörlerin kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir pestisit grubudur (Maitra ve Mitra, 2008). Organofosforlu insektisitler, etkilerini asetilkolini yıkan asetilkolinesterazı (AChE) inhibe ederek gösterirler. AChE'nin inhibe olması ile sinaptik asetilkolin seviyesinde ciddi bir şekilde yükselme meydana gelir (CARR ve ark., 2002). Organofosforlu pestisitler aynı zamanda pseudokolinesteraz aktivitesinin de inhibe olmasına sebep olmaktadır (KALENDER ve ark., 2006). Bunun yanı sıra organofosforlu bileşikler karaciğer (ULUSOY ve ark., 2004; KALENDER ve ark., 2005a; OGUTCU ve ark., 2008), kalp (OGUTCU ve ark., 2006), böbrek (KALENDER ve ark., 2007), testis (UZUNHİSARCIKLİ ve ark., 2007) gibi organlarda toksik etkiye sebep olabilmektedir. Ayrıca

organofosforlu metil parathionun da ince bağırsak dokusu üzerinde patolojik etkiye sebep olduğu gözlenmiştir (ÖĞÜTCÜ ve ark., 2007).

Dichlorvos (2,2 dichlorovinyl dimethyl phosphate, DDVP) depolanmış ürünlerin, mahsüllerin korunması için dünyada yaygın olarak kullanılan organofosforlu bir pestisit olup aynı zamanda halk sağlığında kullanılan bir insektisittir (CHOUDHARY ve GILL, 2001). Dichlorvos seralarda, meyve ve sebze ürünlerindeki mantar sinekleri, afidler, örümcek keneleri, tırtıllar ve beyaz sineklere karşı etkilidir (YARSAN ve ÇAKIR, 2006). Dichlorvos akciğer, mide ve deri yolu ile hızlı bir şekilde vücut içine alınır (RAHEJA ve GILL, 2002). Dichlorvosa akut maruz kalmayı takiben ortaya çıkan başlıca toksik etki kolinerjik iletim için can alıcı bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibisyonudur (SARİN ve GILL, 1999). Yapılan

çalışmalarda dichlorvosun üreme sistemi (OKAMURA ve ark., 2005) ve karaciğer dokusu (OGUTCU ve ark., 2008) üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu belirlenmiştir.

Pestisit zehirlenmeleri ile ilgili çalışmalarda vitamin C ve vitamin E kullanılmaktadır (KALENDER ve ark., 2007; UZUNHİSARCIKLİ ve ark., 2007; OGUTCU ve ark., 2008) Vitamin C suda çözünebilir, vitamin E ise yağda çözünebilir bileşiklerdir (YOUNG ve WOODSIDE, 2001). Vitamin E'nin serbest radikal oluşumunu önleyebileceği (KALENDER ve ark., 2004; KALENDER ve ark., 2005b) ve biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunu etkili şekilde azaltabileceği gösterilmiştir (KALENDER ve ark., 2002). Vitamin E'nin esas fonksiyonu hücre zarlarında ve lipoproteinlerde peroksil radikallerini toplayarak lipid peksidasyonun zincir reaksiyonunu kırmaktır (YOUNG ve WOODSIDE, 2001). Vitamin C süperoksit, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidrosil ve peroksil radikallerini temizler (SENTHIL KUMAR ve ark., 2004). Aynı zamanda α -tokoferolün aracılık ettiği pro-oksidasyon vitamin C tarafından sonlandırılabilir (SENTHIL KUMAR ve ark., 2004).

Bu çalışmanın amacı dichlorvos uygulandıktan 24 saat, 4 hafta ve 7 hafta sonra ratların ince bağırsak dokularında meydana gelen histopatolojik değişiklikleri incelemek, bunun yanı sıra dichlorvosun ince bağırsak dokusunda sebep olduğu patolojik değişiklikler üzerine vitamin C ve vitamin E kombinasyonunun koruyucu rolünü incelemektir.

Materyal ve Metot

Hayvanlar: Etik kurallara uyularak yapılan bu araştırmada 310-340 g ağırlığında erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edilen ratlar özel besleme kafesleri içinde, her kafeste 6 rat olacak şekilde yerleştirildi. Ratlar standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi. Ratlara 18-22 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı. Ratlar uygulama yapılmadan 10 gün önce karantina altına alındı.

Kimyasallar: %98 saflıkta dichlorvos, Ankara Zirai Mücadele Merkezi'nden sağlandı. Vitamin E (DL- α -tokoferol) (Merck) ve vitamin C (L-askorbik asit) (Carlo Erba), Dizdärer firmasından sağlandı.

Hayvanlara Uygulama Planı: Ratlar kontrol grubu (n=18) ve uygulama grubu (n=54) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Uygulama grubu da kendi içinde üç gruba ayrıldı, Dichlorvos uygulanan grup (n=18), vitamin C+vitamin E uygulanan grup (vitamin grubu) (n=18), vitamin C+vitamin E+dichlorvos uygulanan grup (n=18). Her gruptan 6 rat uygulamadan 24 saat, 4 hafta ve 7 hafta sonra disekte edildi ve ince bağırsak dokuları ışık mikroskobu incelemeleri için alındı.

Tüm maddeler sabah saatlerinde (09:00-10:00 arasında) ve aç olmayan ratlara uygulanmıştır. Uygulamanın ilk yapıldığı gün deneyin 0. günü olarak kabul edilmiştir.

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

Vitamin C+vitamin E muameleli grup: Her bir rata günlük 200 mg/kg vitamin C (L-askorbik asit) oral gavaj yolu ile verildi. Daha sonra aynı hayvanlara 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.

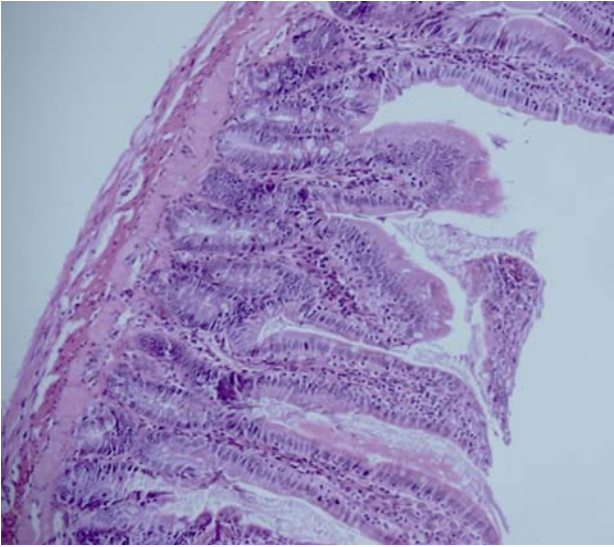
Dichlorvos muameleli grup: Her bir rata günlük 1,6 mg/kg (1/50 LD₅₀) dozunda dichlorvos mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yolu ile verildi.

Vitamin C+vitamin E+dichlorvos muameleli grup: Her bir rata günlük 200 mg/kg dozda vitamin E (DL- α -tokoferol) mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yolu ile verildi. Yine aynı hayvanlara 200 mg/kg dozda vitamin C (L-askorbik asit) distile su içinde çözülerek yine oral gavaj yolu ile verildi. Aynı hayvanlara günlük 1,6 mg/kg (1/50 LD₅₀) dozunda dichlorvos mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yolu ile uygulandı. Ratlara dichlorvos uygulaması vitaminler uygulandıktan 30 dakika sonra yapıldı.

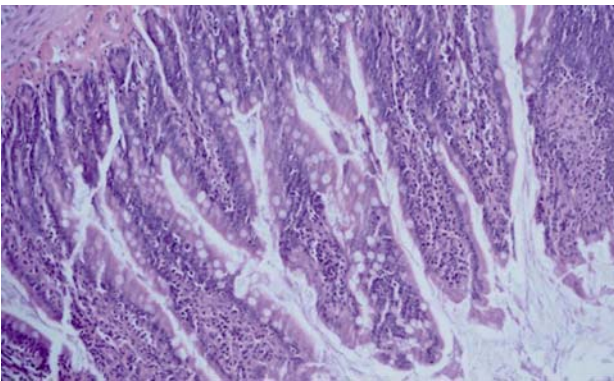
Işık Mikroskobu İncelemeleri: Histopatolojik incelemeler için, ince bağırsak dokuları disekte edildi ve doku örnekleri formaldehit solusyonu içinde 24 saat tespit edildi, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre olan dokular parafin ortamında bloklandı. Parafin bloklardan 4-5 μ m kalınlığında ince kesitler alındı ve alınan kesitler ışık mikroskobu incelemeleri için hematoksin-eozin ile boyandı. Kesitler fotoğraf makinesi ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus DP70) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Bulgular

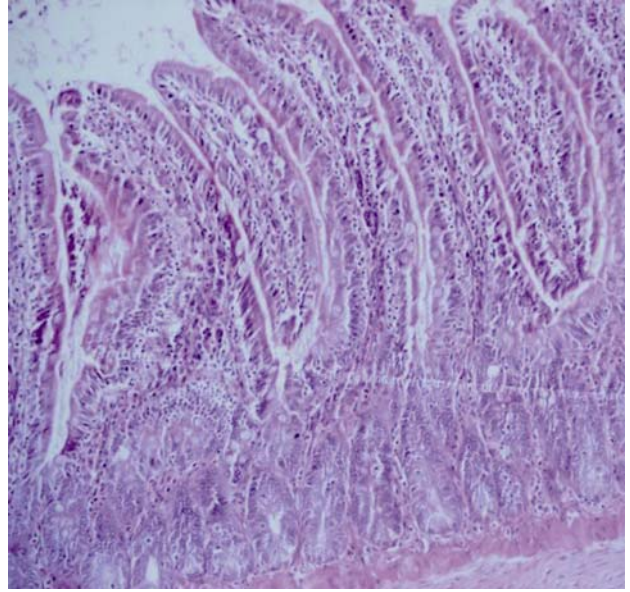
Kontrol grubu ve vitamin C+vitamin E uygulanan ince bağırsak dokularındaki villuslar ve villuslar üzerindeki epitelyum hücreleri normal yapıda gözlemlendi (Şekil 1, Şekil 2). Dichlorvos ve vitamin+dichlorvos uygulanan ratlarda 24 saat sonra herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Şekil 3, Şekil 4). Dichlorvos muamelesinden 4 hafta sonra ince bağırsak dokusundaki villuslarda kısalma ve enine kalınlaşma izlendi (Şekil 5). Vitamin C+vitamin E+dichlorvos muameleli ratların ince bağırsak dokusunda yüzey epitelinde dökülme gözlemlendi (Şekil 6). Dichlorvos muamelesinden 7 hafta sonra ince bağırsak dokusunda villuslarda kısalma ve enine genişleme görüldü (Şekil 7). 7 hafta sonunda vitamin C+vitamin E+dichlorvos muameleli ratların ince bağırsak dokusunun yüzey epitelinde dökülmeler gözlemlendi (Şekil 8).



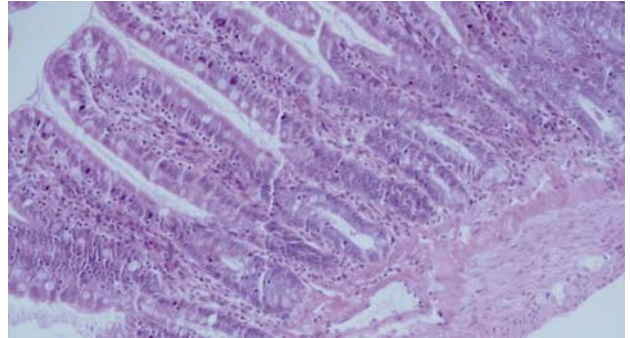
Şekil 1. Kontrol grubu ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. X200.



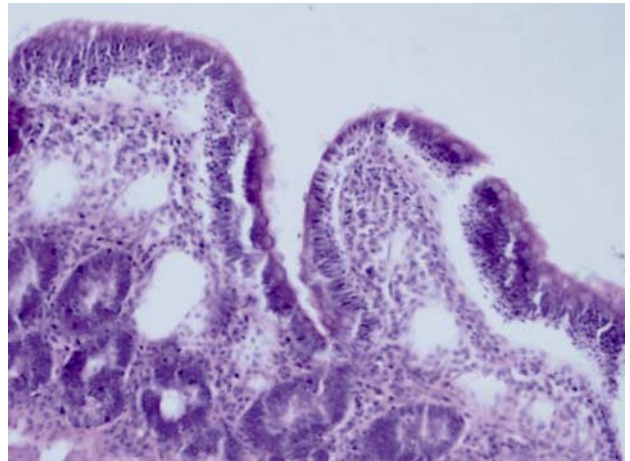
Şekil 2. Vitamin C+vitamin E uygulanmış ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. X200.



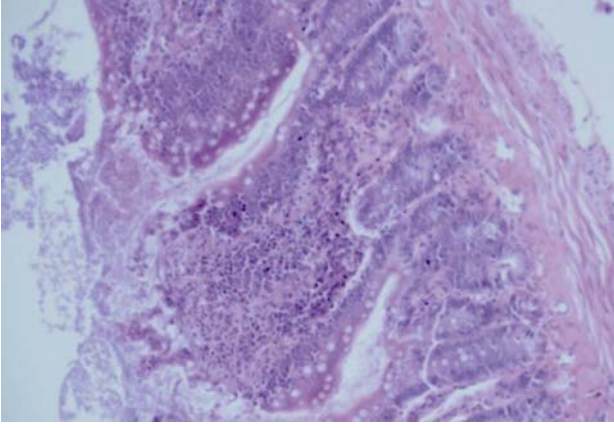
Şekil 3. Dichlorvos muamelesinden 24 saat sonra ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. X200.



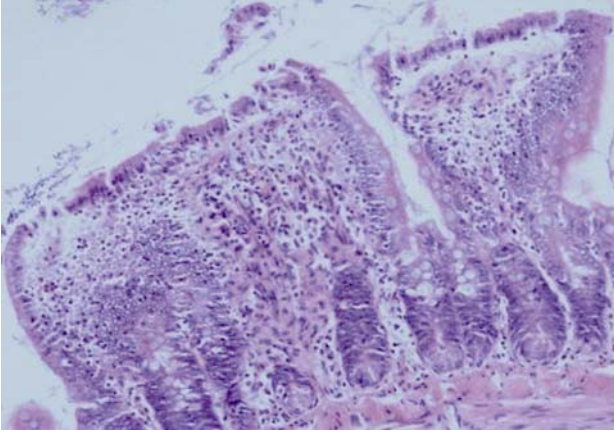
Şekil 4. Vitamin C+vitamin E+dichlorvos muamelesinden 24 saat sonra ratların ince bağırsaklarının histolojik yapısı. X200.



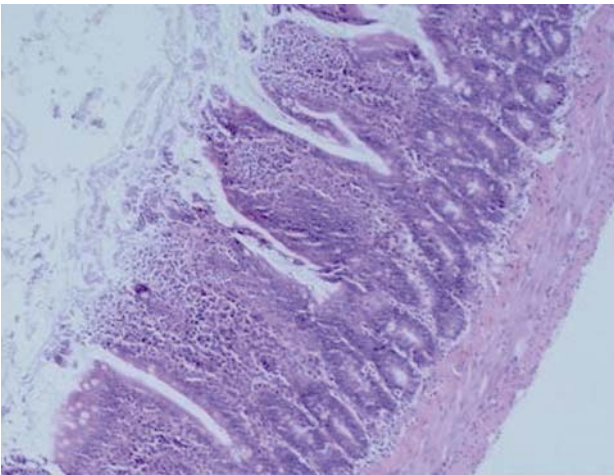
Şekil 5. Dichlorvos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda kısalma ve enine genişleme. X200.



Şekil 6. Vitamin C+vitamin E+dichlorvos muamelesinden 4 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında yüzey epitelinde dökülme. X200.



Şekil 7. Dichlorvos muamelesinden 7 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında villuslarda kısalma ve enine genişleme. X200.



Şekil 8. Vitamin C+vitamin E+dichlorvos muamelesinden 7 hafta sonra ratların ince bağırsaklarında yüzey epitelinde dökülme. X200.

Tartışma ve Sonuç

Dichlorvosun da dahil olduğu organofosforlu bileşiklerin deri, sindirim kanalı ve özellikle akciğerlerden hızlı bir şekilde absorbe olabildiği deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir (DESI ve NAGYMAJTENYI, 1999). Dichlorvosun erkek ratlar için akut oral LD₅₀ değeri 80mg/kg'dır (OKAMURA ve ark., 2005). Dichlorvos yalnızca memeli canlılar üzerinde toksik etki göstermez aynı zamanda balıklar, kuşlar, bal arıları ve hedef olmayan omurgasızlar üzerinde de toksik etkilere sebep olabilmektedir (URAL ve KÖPRÜCÜ, 2006).

Ratlara subkutan yoldan uygulanan 1mg/kg ve 4 mg/kg dichlorvosun sperm motilitesinde azalmaya sebep olduğu ifade edilmiştir (OKAMURA ve ark., 2005). 1,6 mg/kg dichlorvosun oral yoldan uygulandığı ratlarda hepatotoksik hasar gözlenmiştir (OGUTCU ve ark., 2008). Bu çalışmada da dichlorvos 1/50 LD₅₀ oranında erkek ratlara uygulandı ve uygulamadan 4 ve 7 hafta sonra ratların ince bağırsak dokularında patolojik bulgulara rastlandı. Deneysel periyot boyunca ratlarda ölüm meydana gelmedi.

Pestisitler çeşitli dokularda histopatolojik ve sitopatolojik değişikliklere neden olmaktadır (KALENDER ve ark., 2004; KALENDER ve ark., 2005a; OGUTCU ve ark., 2006; UZUNHİSARCİKLİ ve ark., 2007; OGUTCU ve ark., 2008). Organofosforlu bir pestisit olan metil parathionun uygulandığı sıçanların ince bağırsak dokularında villuslarda dejenerasyon, granülasyon, genişleme ve bazı bölgelerde hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir (ÖĞÜTCÜ ve ark., 2007). Bu çalışmada dichlorvos muamelesinden 4 ve 7 hafta sonra villuslarda dejenerasyon tespit edildi.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda vitamin C ve E kombinasyonunun pestisitlerin sebep olduğu hasarı önlediği ya da azalttığı bildirilmiştir (UZUNHİSARCİKLİ ve ark., 2007; KALENDER ve ark., 2007; OGUTCU ve ark., 2008). Vitamin E biyolojik membranlarda bulunan lipidde çözünebilir, potansiyel bir antioksidandır. Vitamin C ekstrasellüler alandaki serbest radikalleri toplar ve tokoferoksil radikalini tokoferole redükler (SENTHIL KUMAR ve ark., 2004). Bu çalışmada vitamin C+vitamin E+dichlorvos uygulanmış ratların ince bağırsaklarında histopatolojik değişiklikler gözlemlendi.

Sonuç olarak dichlorvos ratların ince bağırsak dokularında histopatolojik değişikliklere sebep oldu. Vitamin C ve E kombinasyonu dichlorvos ile birlikte verildiğinde de ince bağırsakta patolojik değişiklikler gözlemlendi. Vitamin C ve E kombinasyonunun ince bağırsakta dichlorvosun sebep olduğu hasarı önleyemediğini söylemek mümkündür.

Kaynaklar

1. Carr RL, Richardson JR, Guarisco JA, Kachroo A, Chambers JE, Couch TA, Durunna GC, Meek EC, (2002). *Effect of PBC exposure on the toxic impact of organophosphorus insecticides*. Toxicol Sci 67, 311-321.
2. Choudhary S, Gill KD, (2001). *Protective effect of nimodipine on dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rat brain*. Biochem Pharmacol. 62, 1265-1272
3. Desi I, Nagymajtenyi L, (1999). *Electrophysiological biomarkers of an organophosphorus pesticide, dichlorvos*. Toxicol Lett 1, 55-64.
4. Kalender S, Kalender Y, Ateş A, Yel M, Olcay E, Candan S, (2002). *Protective role of antioxidant vitamin E and catechin on idarubicin-induced cardiotoxicity in rats*. Braz J Med Biol Res. 35, 1379-1387.
5. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F, (2004). *Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: The protective effect of vitamin E*. Toxicology 3, 227-235.
6. Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Acikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y, (2005a). *Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes*. Toxicology 211, 197-206.
7. Kalender Y., Yel M., Kalender S., (2005b). *Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin*. Toxicology. 209 (1), 39-45.
8. Kalender Y, Uzunhisarcikli M, Ogutcu A, Acikgöz 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.
9. Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Cevrimli BS, Yildirim M, (2007). *Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E*. Pestic Biochem Phys. 88, 213-218.
10. Maitra SK, Mitra A, (2008). *Testicular functions and serum titers of LH and testosterone in methyl parathion-fed roseringed parakeets*. Ecotoxicol Environ Safe. 71, 236-244.
11. Ogutcu A, Uzunhisarcikli 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 Phys. 86, 93-98.
12. Ogutcu A, Suludere Z, Kalender Y, (2008). *Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E*. Environ Toxicol Pharm. 26, 355-361.
13. Okamura A, Kamijima M, Shibata E, Ohtani K, Takagi K, Ueyama J, Watanabe Y, Omura M, Wang H, Ichihara G, Kondo T, Nakajima T, (2005). *A comprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorvos in Wistar rats*. Toxicology 213, 129-137.
14. Ögütçü A, Ulusoy Y, Kahraman K, Uzunhisarcikli M, Uzun FG, Taştan H, (2007). *Metil parathion'un sıçanların ince bağırsak dokusu üzerine etkisi ve vitamin C ve E'nin koruyucu rolü*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 18, 21-26.
15. Raheja G, Gill KD, (2002). *Calcium homeostasis and dichlorvos induced neurotoxicity in rat brain*. Mol Cell Biochem. 232, 13-18 (2002).
16. Sarin S, Gill KD, (1999). *Dichlorvos induced alterations in glucose homeostasis: possible implications on the state of neuronal function in rats*. Mol Cell Biochem. 199, 87-82.
17. Senthil Kumar J, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J, (2004). *Effects of Vitamin C and Vitamin E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells*. Reprod Toxicol. 19, 201-208.
18. Ulusoy Y, Toprak B, Uzunhisarcikli M, Ögütçü A, (2004). *Diazinonun sıçan hepatositleri üzerine etkisinin elektron mikroskopu ile incelenmesi*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 15, 1-2.
19. Ural MŞ, Köprücü SŞ, (2006). *Acute toxicity of dichlorvos on Fingerling European Catfish, Silurus glanis*. Bull Environ Contam Toxicol 76, 871-876.
20. Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu 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 Phys. 87, 115-122.
21. Yarsan E, Cakir O, (2006). *Effects of dichlorvos on lipid peroxidation in mice on subacute and subchronic periods*. Pestic Biochem Physiol 86, 106-109.
22. Young, IS, Woodside JV, (2001). *Antioxidants in health and disease*. J Clin Pathol. 54,76-86.

Arbovirus enfeksiyonları

Elvin ÇALIŞKAN¹, Burak GÜNGÖR¹

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Viral Aşı Üretim Laboratuvarı-ANKARA

Özet: Arbovirus enfeksiyonları tüm dünyada eklem bacaklılar tarafından omurgalılara bulaştırılan ve son zamanlarda önemi giderek artan viral enfeksiyonlardır. Dünyadaki iklim değişikliklerinin artmasıyla birlikte bu virusların taşıyıcıları olan eklem bacaklılarında yaşam alanları değişmekte ve genişlemektedir. Bunun sonucunda arboviruslar da yeni yaşam stratejileri geliştirebilmektedirler. Son yıllarda insanlarda ve diğer evcil memelilerde bildirilen arbovirus enfeksiyonlarındaki ciddi artış bu stratejilerde başarılı olduklarını göstermektedir. Bu derlemede arbovirusların yaşam ve yayılma stratejileri ve Türkiye’de görülen ve görülme riski yüksek olan bazı önemli Arbovirus enfeksiyonları ele alınmıştır.

Anahtar sözcükler: Arbovirus, ensefalit, kanamalı ateş.

Arboviral infections

Summary: Arboviral infections are emerging important infections transmitted by arthropods to vertebrates across the world. As the climate of the world changes rapidly, habitats of the arthropod vector of these viruses change and increase. The consequences of these changes are new survival strategies of Arboviruses. These strategies are seem to be succesfull since the number of reported arboviral infections both in humans and in domestic animals have been significantly increased for the past years. This review aimes to give information about Arbovirus survival and spread strategies in nature. Also information about some important arbovirus infections detected and having potential of beeing detected in Turkey are given.

Key Words: Arbovirus, encephalitis, haemorrhagic fever.

Giriş

Tüm dünya hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit eden Arboviral enfeksiyonlar, kan emen eklem bacaklı vektörler (çoğunlukla sivrisinek ve keneler) ile bulaşan bir grup virus tarafından oluşturulur. Arboviruslar, farklı filumlara (eklem bacaklılar ve omurgalılar) ait türlerde başarılı bir viral çoğalma evresini gerçekleştirebilme yetisine sahiptir. Bu durumda dikkatler böyle karışık bir nakil döngüsünün üstesinden gelebilen Arbovirusların genetik yapısı üzerine yoğunlaşmaktadır (KUNO ve CHANG, 2005). Arboviruslar, büyük çoğunluğu hata okuma (proofreading) mekanizmasından yoksun ve dolayısıyla yüksek mutasyon oranlarına sahip olan değişik virüs ailelerine ait RNA viruslarını kapsayan heterojen bir virüs grubudur. Arbovirus grubu *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Arenaviridae*, *Rhabdoviridae* ailelerindeki viruslardan oluşur (GUBLER, 2002).

Togaviridae: *Togaviridae* ailesinde bulunan *Alfavirus* grubunun tamamı arbovirustur. Vektör *Aedes* ve *Culex* cinsi sivrisineklerdir. Rezervuar konaklar ise enfeksiyona bağlı olarak değişmekle birlikte kuşlar, insan ve atlar olabilmektedir. Sebep ol-

duğu bazı arboviral enfeksiyonlar *Venezüella at ensefaliti*, *Doğu at ensefaliti*, *Batı at ensefaliti* ve *Chikungunya*’dır (GUBLER, 2002; FLINT ve ark., 2004).

Flaviviridae: Son yıllarda önemi giderek artan enfeksiyonlar arasında bulunan *Batı Nil (WN)*, *Deng Ateşi*, *Sarı Humma*, *Kene kaynaklı ensefalitler*, *Japon Ensefalit Virus* ve *Louping ill*, *Flavivirus* genusunda bulunur. Bu genus vektör olarak sivrisinek ve keneleri kullanır (FLINT ve ark., 2004; FIGUEIREDO 2007).

Bunyaviridae: Bu ailedeki birçok farklı genus (*Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus* ve *Phlebovirus*) arboviral enfeksiyonlara sebep olur. İnsan ve hayvan sağlığı açısından önem taşıyan *Kırım Kongo Kanamalı Ateşi*, *Rift Vadisi Ateşi*, *Akabane*, *Uukunieme* ve *La Crosse enfeksiyonları* bu grup içerisinde yer alır (FLINT ve ark., 2004).

Reoviridae: Bu ailede yalnızca Orbivirus’lar Arbovirus grubu içinde yer alırlar Vektörleri sivrisinek (*Clulicoides spp.*) ve kenelerdir. *Mavidil*, *Epizootik Hemorajik Hastalık*, *Afrika At Vebası*, *Colorado Kene Ateşi* reovirusların sebep olduğu ba-

zı arboviral enfeksiyonlardır (MURPHY ve ark., 1999).

Rhabdoviridae: *Ephemerovirus* genusuna dahil *Bovine Ephemeral Ateş* ve *Vesiculovirus* genusu içerisinde bulunan *Veziküler Stomatitis Rhabdoviridae* ailesine ait arboviral enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonların vektörü sivrisineklerdir (FLINT ve ark., 2004).

Arboviral Enfeksiyonların Yayılımı: Enfeksiyonun naklinde Arboviruslar, kan emen artropodlarda (vektör) meydana gelen viral çoğalma evresini takiben omurgalı konakları enfekte ederler. *Biyolojik nakil* olarak adlandırılan bu yol arbovirusları hayvan virusları arasında benzersiz bir konuma yerleştirir. Biyolojik nakilde üç esansiyel bileşen vardır; virus, vektör ve omurgalı konak. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) temel arbovirus tanımlamasında yer alan biyolojik nakile ek olarak direkt nakil de viral yayımda kullanılan diğer bir yol olarak tanımlanmaktadır (KUNO ve CHANG, 2005). *Venezüell at ensefaliti* ve *Dang ateşi* virusları omurgalıları aerosol yolla enfekte edebilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Batı Nil'in de direk yolla bulaştığı saptanmıştır. *Veziküler Stomatitis* virusunun laboratuvar koşullarında oral yolla bulaşabildiği gösterilmiştir (KUNO ve CHANG, 2005). Arbovirusların naklinde diğer bir yol ise kan emen artropodların kontamine ağız organelleri ile virusu bir konaktan diğer konağa taşıdıkları mekanik nakildir (MEAD ve ark., 2000).

Vektörler bir kere enfekte olduktan sonra hayat boyu enfekte olarak kalırlar. Kan emen sineklerin aksine, kenelerde virus transstadial nakile bağlı olarak olgunlaşma evrelerinde de varlığını devam ettirir. Vertikal bulaşma arboviral persistensin doğadaki önemli bir mekanizmasıdır. Vektörlerdeki viral persistens ve vertikal bulaşma, sadece virusun doğada varlığını sürdürmesinde değil ayrıca biyolojik naklinde de önemlidir. Diğer bir viral persistens mekanizması ise biyolojik nakilde en önemli ihtiyaçlardan biri olan viremidir. Kanda bulunan yüksek miktarda virus ve uzun süreli viremi, vektörün omurgalı konaktan virusu alımını ve virusun doğada varlığını sürdürme şansını artırır (KUNO ve CHANG, 2005; GOULD ve ark., 2006). Arboviral enfeksiyonların yayılımında omurgalı konaklar daha çok kısa süreyle virusu barındırırken, vektörler çok daha uzun sürelerde virusu taşıyarak doğal rezervuar görevi görür (KUNO ve CHANG, 2005).

Arboviruslar varlıklarını sürdürmek için üç ana strateji geliştirmişlerdir. Bu stratejilerden ilki, enfekte vektörler vasıtasıyla farklı yerleşim alanlarında bulunan duyarlı omurgalı konaklara ulaşabilme yoludur. İkincisi, omurgalı konak tercihini yüksek üreme oranına sahip olanlar arasından yapmaktadır. Üçüncü strateji ise immun reaksiyonlardan kaçarak enfekte konakta varlığını sürdürebilmektir (KUNO ve CHANG, 2005). Bunlara ek olarak arbovirusların yüksek mutasyon kabiliyetleri ve geniş konakçı spektrumları değişen çevresel koşullara çok hızlı adapte olmalarını sağlar. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, arbovirusların doğada nispeten stabil olduğunu göstermektedir (COFFREY ve ark., 2008).

Arboviruslar, iklimsel değişiklikler ve çevresel koşullarla diğer viruslara oranla daha çok etkileşim içindedirler. Ekolojik değişiklikler bu virusların vektörlerini ve onların yaşam sahalarını da değiştirdiğinden bu ajanların konak sistemleri ve yayılmaları da değişmektedir. Bu şekilde arboviruslar oldukça uzak bölgelere ve ülkelere iklim koşulları izin verdiği sürece yayılabilirler (FIGUEIREDO 2007). Orman alanlarının yok edilmesi, ormanlık alanlar ile yaşam alanlarının birleşmesi, ülkeler arası hayvan ticareti, savaşlar gibi modern yaşantının olumlu ve olumsuz yönleri de bu virusların doğasını etkilemektedir (GOULD ve ark., 2006).

Türkiye'de var olan ve potansiyel risk oluşturan bazı arboviral enfeksiyonlar

Epizootik Hemorajik Hastalık (EHH):

Epizootik Hemorajik Hastalık (EHH) bazı vahşi gevişenlerin akut ve genellikle ölümcül bir hastalığıdır (MURPHY ve ark., 2006). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda sığırlarında enfekte olduğunu göstermiştir (GAYDO ve ark., 2004). Reovirus ailesine ait olan Epizootik hemorajik Hastalık virusu (EHHV), mavidil virusu ile yakın antijenik ilişkilidir. Ayrıca EHHV, kapsid proteinlerindeki farklılıklara bağlı olarak, 10 adet serotipe sahiptir (MURPHY ve ark., 2006). Bu viruslar genellikle *Culicoides* cinsine ait sivrisinekler ile nakledilir. Enfeksiyon özellikle Ağustos ayından Ekim ayına kadar olan dönemde kendini göstermektedir. Kuzey Amerika, Avustralya, Asya ve Afrika'da EHH'nin varlığı saptanmıştır (OHASHI ve ark., 2002). Klinik seyir Mavidil ile benzerlik gösterir. Yüksek ateş, solunum güçlüğü, baş ve boyunda ani gelişen ödemin yanı sıra, ağız mukozasında, dilde ve sindirim sis-

temi mukozasında erozyon ve ülserler gelişir. Duyarlı konaklarda ölüm oranı yüksektir (GAYDO ve ark., 2004). Şu an için enfeksiyona karşı etkili bir aşı bulunmamaktadır.

Bovine Ephemeral Ateş: Üç gün hastalığı olarak da bilinen Bovine Ephemeral Ateşi (BEF), sığırların ekonomik yönden önemli bir hastalığıdır. Özellikle yüksek verimli hayvanlarda ölümle seyreden şiddetli bir enfeksiyon tablosu gelişebilir. Bovine Ephemeral Ateş virusu (BEFV) *Ephemerovirus* genusuna dahil bir *Rhabdovirus*tur. BEF' in asıl vektör türü tam olarak belirlenememiştir. Ancak virus farklı türlere ait Anopheline ve Culicine sivrisinekleri ile nakledilebilmektedir. Afrika, Avustralya, Orta doğu ve Asya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde endemiktir. Enfeksiyon, belirli bir coğrafyada yerel salgınlar ya da mevsimsel epizootiler şeklinde ortaya çıkar (WALKER, 2005). Hastalık biyolojik nakil haricinde yakın temas, vücut sıvıları ve aerosol damlacıklar yolu ile bulaşmaz. Hastalık genellikle 3 gün sürer. İlk ateş fazında süt miktarında ani bir düşüş meydana gelir. Buna takip eden ikinci günde depresyon, iştahsızlık başlar, burun ve göz akıntısı oluşur ve kaslarda güçsüzlük, topallık, eklemlerde şişlik meydana gelir. İlerleyen vakalarda felç oluşabilir, hayvanlar yerden kalkamaz duruma gelir. Buna bağlı olarak ruminal stasis başlar ve bu durum 10-15 gün devam edebilir. Hayvanlar hafif seyirli enfeksiyonlarda 3. günden itibaren iyileşme dönemine girer (CHAN ve ark., 2005). BEF' den koruma amacıyla aşı çalışmaları yapılmaktadır. Ancak birçok farklı canlı attenüe, inaktif ve rekombinant aşı formu bildirilmiş ise de etkinlik süresi ve düzeyi ile ilgili sonuçlar çeşitlilik göstermektedir (WALKER, 2005).

Mavidil: 1905 yılında Güney Afrika' da Mavidil adını alan bu enfeksiyon 1940' lara kadar sadece bu bölgede tanımlanırken, son yıllarda daha önce bu enfeksiyondan arı olduğu bilinen İngiltere ve birçok Avrupa ülkesinde de ciddi salgınlar meydana getirdiği rapor edilmiştir (MERTENS ve ark., 2007). Mavidil, çiftlik hayvanlarının önemli bir enfeksiyonudur. Mavidil virusu koyun, keçi, sığır ve diğer birçok ruminant türünü de enfekte etmektedir. Enfekte sığırlar, 12-14 haftaya kadar uzayabilen viremi dönemi ile mavidil epidemiyolojisinde önemli rezervuarlardır (MELLOR ve WITTMANN, 2002). Mavidil virusu, koyunlarda özellikle de yüksek verime sahip ırklarda, yüksek ateş, nazal akıntı

baş bölgesinde ödem, oral mukozalarda hiperemi ve ülserasyon, dilde siyanoz ve ayak leyonları ile seyreden klinik tablo oluşturur. Ayrıca döl veriminde azalma, abort ve konjenital anomalilere de neden olmaktadır (MURPHY ve ark., 1999; MELLOR ve WITTMANN, 2002). Hastalık duyarlı bireyler arasında *Culicoides* cinsi sokucu sinekler tarafından nakledilmektedir. Enfeksiyon vektör popülasyonunun ortaya çıktığı yaz sonu ve sonbahar aylarında görülmektedir (WITTMANN ve ark., 2001). Mavidil virusunun aralarında çapraz bağışıklık bulunmayan 24 farklı serotipe sahip olması, hastalık ile mücadelede en önemli engeller arasındadır (MERTENS ve ark., 2007).

Ülkemizde mavidil virusunun varlığı ilk olarak 1944 yılında Hatay bölgesinde bildirilmiştir. Bunu takiben 1978 ve 1979 yılları arasında Yoncu ve ark. (1982) tarafından ikinci bir mavidil salgını rapor edilmiş ve etken serotip 4 olarak tanımlanmıştır. Şu an ülkemizde tip 4, 9 ve 16 olmak üzere 3 farklı serotip bulunmaktadır (ERTÜRK ve ark., 2004). Mavidil, 3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanununun 4 üncü maddesine göre ihbarı mecburi hastalıklar arasındadır. Günümüzde Mavidil enfeksiyonu ile mücadele attenüe canlı ve inaktif aşular ile gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla ülkemizde serotip 4'e karşı üretilen attenüe canlı aşular kullanılmaktadır. Ancak son yıllardaki asıl amaç rekombinant teknikler kullanılarak, virusun farklı serotiplerine karşı bağışık yanıt oluşturacak, güvenilir ve aşı ile aşısız hayvanların ayırt edilmesine (DIVA) olanak sağlayan aşuların üretimidir. Canlı aşuların olası dezavantajlarına karşın son yıllarda Avrupa' da belirli serotiplere karşı inaktif aşı üretilmekte ve kullanılmaktadır (SAVINI ve ark., 2008; SCHWARTZ-CORNIL ve ark., 2008).

Veziküler Stomatitis: Şap ve Veziküler Stomatitis (VS) enfeksiyonları klinik olarak birbirinden ayırt edilemez. Ancak atların da enfekte olması VS' nin tanısı açısından en önemli noktadır (LETCHWORTH, 1999; RODRÍGUEZ, 2002). Şap enfeksiyonuna kıyasla daha zoonotik özelliktedir. Klinik hastalık tablosunda dil, ağız mukozasında, dudak, burun kenarlarında ve memelerde veziküller ve takiben ülserler gelişir, bu durumda ciddi bir verim kaybı meydana getirir (LETCHWORTH, 1999). Endemik bölgelerde hastalığın salgınlar halinde ortaya çıkışı mevsimsel bir özellik gösterir. Virus nakleden birincil vektör tam olarak saptanamamış-

tır, ancak *Diptera*, *Phlebotomus* ve *Aedes* gibi artropodlar ile nakil önemli bir bulaşma yoludur (NOVELLA ve ark., 2007). Bununla birlikte VS sürüye bir kere girdikten sonra direkt temas ile de yayılmaya başlar. İnsanlarda ise enfeksiyon vezikül sıvısı yada salya ile temas sonucunda gelişir (MEAD ve ark., 2000). Özellikle Amerika kıtasında sığır yetiştiriciliği açısından önemli bir sürü hastalığı olan VS (RODRÍGUEZ, 2002), ülkemizde mavidil enfeksiyonu gibi ihbarı mecburi hastalıklar arasında yer almaktadır. Koruma ve kontrol amacıyla ikincil enfeksiyonlara ve komplikasyonlara uygun olarak destekleyici bir tedavi yapılır. Enfeksiyona karşı Kolombiya ve Venezüella’da inaktif aşılardan üretilmektedir, ancak şu an için ticari bir aşı mevcut değildir.

Venezüella at ensefaliti -Doğu at ensefaliti - Batı at ensefaliti: *Togavirus* ailesine dahil Batı at ensefaliti (EEE), Doğu at ensefaliti (WEE) ve Venezüella at ensefaliti (VEE), Amerika’da atlarda ve insanlarda yüksek ölüm oranı nedeniyle sivrisinekle bulaşan en önemli hastalıklar arasında yer alır. Üç enfeksiyon da esas olarak kuş popülasyonu ve sivrisinekler arasında sirküle eder. EEE ve WEE’de atlar ve insanlar bu enfeksiyonun rastlantısal konaklarıdır, VEE’de ise diğer ikisinden farklı olarak enzootik ve epizootik varyantlar bulunmaktadır. Epizootik VEE, salgınlar sırasında atlarda ciddi düzeyde viremi oluşturur ve bu da enfeksiyonun devamında rol oynar (WAEVER ve BARRETT, 2004; KUNO ve CHANG, 2005). Her üç enfeksiyonun da klinik seyri oldukça benzerdir. Ateş, anoreksi ve depresyon ile başlayan hastalık tablosu, ensefalit gelişimi ile sonlanır. Buna ek olarak, bazı hayvanlarda gastrointestinal sistem bulgularına da rastlanır. Son yıllarda her ne kadar aşılama sonucunda EEE ve WEE epidemilerine rastlanmasada, halen küçük salgınlar oluşmaktadır. Ancak epizootik VEE Güney Amerika’da insan ve at popülasyonunda varlığını sürdürmektedir. Bunun ötesinde epizootik VEE biyoterörizm silahı potansiyeline sahip virüsler arasında yer almaktadır (WAEVER ve BARRETT, 2004). Ayrıca ülkemizde de ihbarı mecburi hastalıklar arasındadır. Her ne kadar bu enfeksiyonlar yaygın olarak Amerika kıtasında görülmekteyse de 2008 yılı içerisinde İngiltere’de ilk defa EEE’nin varlığı rapor edilmiştir (HAVALA ve ark., 2008). Bazı ülkelerde bu enfeksiyonlara karşı aşılardan üretilmektedir, ancak şu an için ticari bir aşı mevcut değildir.

lı VEE aşılı, multivalan inaktif aşılardan daha etkilidir (PAESSLER ve ark., 2006).

Rift Vadisi Ateşi: Rift vadisi Ateşi (RVF) virüsü *Bunyaviridae* ailesinin 5 genusundan biri olan *Phlebovirus* genusuna dahil zoonotik bir arbovirustur. Epizootilerde en önemli bulgu artan abort vakalarıdır. Bu epizootilere, genellikle insanlardaki enfeksiyonlar eşlik eder. RVF ruminantları (sığır, koyun, keçi, deve gibi), insanları, nadiren de kedi, köpek ve atları enfekte eder. *Aedes spp.* cinsine ait sivrisinekler ile nakledilen enfeksiyon, 1970’ler den itibaren Afrika’da ve Arap yarım adasında rapor edilmiştir (GEAR, 1982). İnsanlarda enfeksiyon, enfekte sivrisinek tarafından ısırılarak, tıbbi uygulamalar sırasında ya da enfekte hayvana ait kan ve dokularla temas sonucunda gelişir. Ayrıca gebelerde anneden fötusa vertikal geçişte mümkündür (ADAM ve KARSANY, 2008). Ancak insandan insana geçiş yoktur. Virus, ilk olarak enfekte ettiği sürüde epizootiye sebep olur. Hastalığın klinik seyri hayvanın yaşına, türüne ve ırkına bağlı olarak değişiklik gösterir. RVF özellikle genç hayvanlarda yüksek ölüm oranı (%10-70) ile seyrederek ve gebe ruminantlarda yüksek oranda abortlara sebep olur. Genç hayvanlarda ateş, iştahsızlık, depresyon ve kanlı ishal ile seyrederek ve yüksek bir ölüm oranı vardır. Erişkin hayvanlardaki en önemli belirti gebe hayvanlardaki yüksek abort oranıdır. Buna ek olarak, ishal, kusma, göz ve burun akıntısı gibi genel semptomlar oluşur. İklimsel değişiklikler vektörel yayılım açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda teorik olarak vektörlerin diğer kıtalara ulaşarak enfeksiyonu yeni bölgelere nakledebileceği sonucuna varılmıştır (GOULD ve HIGGS, 2008). Hastalığın belirli bir tedavisi yoktur, hafif seyirli enfeksiyonlarda destekleyici tedavi ile hasta hayvan kendiliğinden iyileşebilir. RVF’ye karşı geliştirilmiş veteriner kullanım amaçlı canlı attenüe ve inaktif formda aşılardan üretilmektedir. Ayrıca askeri personel ve laboratuvar çalışanlarını enfeksiyona karşı korumak amacıyla 1980’ler den itibaren Amerika’da lisanslı RVF aşılı kullanılmaktadır (PITTMAN ve ark., 1999).

Batı Nil Virus Enfeksiyonu: Batı Nil Virüsü (WNV), Afrika, Asya ve Güney Avrupa’da uzun süredir bilinen, artropodlarla bulaşan ve *Flaviviridae* ailesine mensup bir virustur (GODDARD ve ark. 2002; GIRARD ve ark. 2004; GOULD ve ark., 2006). Virus, son zamanlarda in-

sanlarda ve tek tırnaklılarda artan sayıda ensefalit vakası ile seyreden salgınlara sebep olmaktadır. Virus ilk defa Uganda'nın Batı Nil bölgesinde ateşli bir hastalık geçiren bir kadından izole edilmiştir. Kısa bir süre sonra da Afrika, Orta Doğu ve Güney Avrupa'da insanlar, kuşlar ve sivrisineklerde yaygın olan Flaviviruslar arasına girmiştir. Her ne kadar bu bölgelerde enfeksiyonlar sıkça görülmüşse de son zamanlara kadar genellikle hafif veya subklinik seyirli idi. Fakat 1990'ların başından itibaren WNT enfeksiyonunun insanlardaki sıklığı ve ciddiyeti artmıştır (GOULD ve HIGGS, 2008) Dahası, enfeksiyon daha önceleri etkilenmemiş bölgelerde de görülmeye başlamıştır. Buna en çarpıcı örnek virusun 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri New York şehrinde görülmesi ve bunu takip eden 3 yıl içerisinde Kuzey Amerika'da ki omurgalılar ve insanlarda yayılmasıdır (LANCIOTTI ve ark., 1999).

WNV, *Flaviviridae* ailesinde *Flavivirus* genusu içerisinde yer alan Japon Ensefalit virus kompleksi içerisinde yer alır (BUCKLEY ve ark., 2006). Bu kompleksin diğer üyeleri Japon ensefalit virusu, Saint Louis ensefalit virusu ve Murray Valley ensefalit virustur (WEAVER ve ark., 2004). Genom yapılarının filogenetik analizi virusa ait iki hattın varlığını ortaya koymuştur. Birinci hatta ait viruslar Kuzey Doğu Amerika Birleşik Devletleri, İsrail, Afrika, Hindistan ve Rusya'dan izole edilmiş iken, ikinci hatta ait viruslar sadece Sahra Afrikası ve Madagaskar'dan izole edilmiştir (PARREIRA ve ark., 2007).

Diğer Japon ensefalit virus grubundaki viruslar gibi WNV de arthropod nakil siklusu ile varlığını sürdürür. Sivrisinekler ana vektörlerdir. Vahşi kuşlar ise ana konakçıdırlar.

Korunma amacıyla daha önceleri sadece sivrisineklerle mücadele yöntemleri kullanılırken, günümüzde aşılama çalışmaları kullanılmaktadır. Bu amaçla insanlarda ve diğer omurgalılarda inaktif, canlı attenüe ve rekombinant aşı denemeleri yapılmaktadır (LUSTING ve ark., 2000). Türkiye'de West Nile virusunun izolasyonu henüz gerçekleşmemiş olsa da memeli türlerinde serolojik bulgularına rastlanmıştır (ÖZKUL ve ark., 2006).

Kene Kaynaklı Ensefalit Virus: Kene Kaynaklı Ensefalit Virus (TBEV) Avrupa ve Asya'da insanların en tehlikeli nöroenfeksiyonlarından sorumlu olan ajanlar arasındadır (MANDL, 2005). *Flaviviridae* familyasının *Flavivirus* genusuna da-

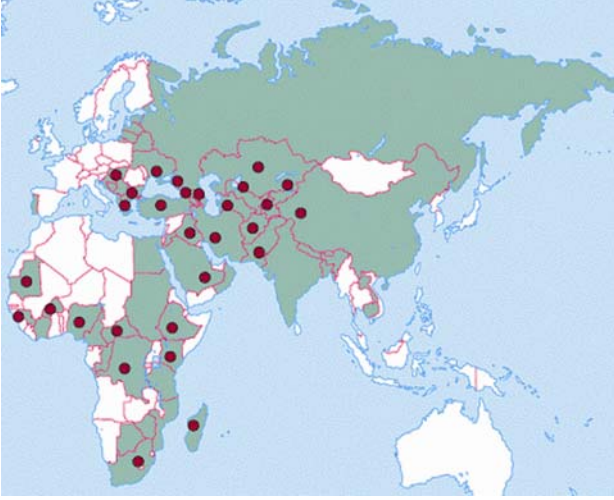
hildir (HEINZ ve ark., 2000). Yıllardan yıla ve bölgeden bölgeye değişmekle birlikte, yılda ortalama 10000 civarında hastane vakası rapor edilmektedir. Doğal koşullarda virus keneler (*Ixodes ricinus* ve *Ixodes persulcatus*) ve bazı vahşi omurgalılarda sirküle olur fakat endemi meydana getirebilmesi için özellikle kene ve omurgalılar arasında horizontal nakil gereklidir (NUTTALL ve LABUDA, 2003). TBE, insanlara genellikle yetişkin kenenin ısırmasıyla geçer. Bazen de nadir vakalarda kenelerin ısırmasıyla virüsü barındıran ve viremik faz sırasında virüsü süte aktarabilen koyun ve keçilerin pastörize edilmemiş sütlerinin tüketilmesiyle bulaşır (BURKE ve MONATH, 2001). İnsanlar hastalığın son konakçısıdır ve virusun doğada sirküle olmasında rol almazlar.

TBE ile mücadele amacıyla formalin ile inaktive edilmiş virus aşılı kullanılmaktadır ve hastalığa karşı oldukça yüksek bir bağışıklık kazandırmaktadır. Yılda ortalama 700 vakanın meydana geldiği Avusturya'da popülasyonun neredeyse %90'ı aşılanmıştır ve bu yoğun aşılama programının başlamasıyla vaka sayısında belirgin düşüş gözlemlenmiştir (KUNZ, 2003).

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Enfeksiyonu: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKA), Afrika, Asya, Batı Avrupa ve Orta Doğu'da görülen ölümcül bir virus enfeksiyonudur (WATTS ve ark., 1988). KKKA'nın tarihteki ilk bahsine 12. yy. da bugünkü Tacikistan bölgesinde rastlamaktayız. Hastalık normalde karavuklara parazitlenen bir kene tarafından oluşturulan ve insanlarda idrarda, rektumda, dişetlerinde ve karın boşluğunda kanamalara yol açan hemorajik bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Ayrıca hastalık Özbekistan'da yüzyıllardır değişik adlarla bilinmektedir (HOOGSTRAAL, 1979).

Hastalık 1960'lı yılların ortalarına kadar iki ayrı virus tarafından oluşturulan iki ayrı hastalık olarak düşünülmekteydi ve Kırım hemorajik ateşi ve Kongo hemorajik ateşi adlarıyla anılmaktaydı (SIMPSON ve ark., 1967). Daha sonra bu bölgeden (Kazakistan ve Özbekistan) izole edilen viruslarla (CASALS, 1969), Afrika'da Kongo ve Uganda'dan izole edilen ve Kongo virusunun aslında aynı viruslar olduğu tespit edilmiştir. Bu keşifle birlikte hastalık son şeklini almış ve Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi olarak adlandırılmıştır (CASALS ve ark., 1970).

Hastalığın etkeni olan virus *Bunyaviridae* ailesine mensup *Nairovirus* genusunda yer alır ve insanlarda %3-30 oranında ölüm oranına sahip ciddi hastalık tabloları meydana getirir (ERGÖNÜL ve ark., 2004). KKKAV'nin coğrafik dağılımı tıbbi açıdan önemli kene kaynaklı enfeksiyonları içerisinde en geniş olanıdır (Şekil 1).



Şekil 1: KKKAV' nin Dünya'daki Coğrafi Dağılımı (ERGÖNÜL, 2006)

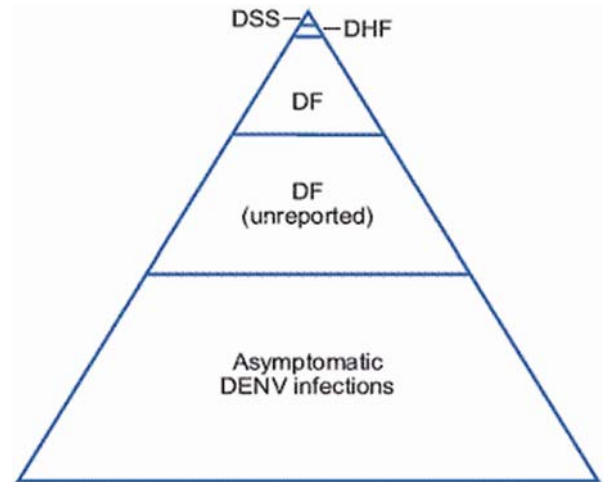
- Virus izole edilen bölgeler
- Risk altında olan bölgeler

KKKA enfeksiyonunun insanlara bulaşmasında en önemli yol virus taşıyıcısı olan *Hyalomma* genusuna ait kenelerin ısırmasıdır. Bunun dışında KKKA, enfeksiyonun akut fazında olan hastalarla direkt temas veya viremik dönemde olan hayvanların kan veya organlarıyla temas virusun bulaşmasında rol oynar (WHITEHOUSE, 2004). Evcil hayvanlarda hastalık tablosu çok hafif veya subklinik halde seyrederken insanlarda progresif hemoraji, myalji ve ateşle seyreden ciddi hastalık tabloları meydana getirmektedir. Türkiye'de son altı yılda meydana gelen vakaların sayısı dramatik bir şekilde artmıştır. Her ne kadar komşu ülkelerde hastalığa ait epidemiler 1970'lerden beri bildirilmekte ise de, ilk KKKA vakası ülkemizde 2002 yılında bildirilmiştir (KARTI ve ark., 2004). 2002-2005 yılları arasında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 500 vaka rapor edilmiştir ve bunların 26'sı (%5.2) ölümle sonuçlanmıştır (T.C.Sağlık Bakanlığı, 2005).

Hastalığın tedavisinde şu anda sadece semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Ribavirin tedavisinin faydalı olduğu her ne kadar çoğu ülkede onaylanmamışsa da yapılan bir in-vitro çalışma

(WATTS ve ark.,1989) ribavirinin viral aktiviteyi engellediğini bildirmiştir. Günümüzde hastalığa karşı her hangi bir etkin aşı bulunmamaktadır, ancak çalışmalar devam etmektedir.

Deng Ateşi: Dünya'da her yıl 100 kişiden biri *Deng virusun* (DENV) 4 serotipinden birisiyle enfekte olmaktadır. Virus *Flaviviridae* ailesi içerisinde yer alan *Filavivirus* genusu içerisinde yer alır. Deng Ateşi/Deng Hemorajik ateşi/ Deng Şok Sendromu (DF/DHF/DSS) epidemisi ilk kez 50 yıl önce Güney Doğu Asya'da ortaya çıkmıştı Ancak hastalığın Amerika'da görülmesi 1981 yılında, Güney Asya'da görülmesi ise 1989 yılında gerçekleşmiştir (KYLE ve HARIS, 2008). DHF/DSS'nin ilk ortaya çıktığı 1950'lerden bu yana insidensi 500 kat artmıştır ve dünyada neredeyse yüzü aşkın ülkede salgın meydana getirmektedir (WHO, 2000). Hastalığın bulaşmasında *Aedes* cinsi (özellikle *aedes aegypti* ve *aedes albopictus*) sivrisinekler önemli rol oynar. Klinik olarak en önemli belirtiler ateş, baş ağrısı, retro-orbital ağrı, myalji, arthralji ve kaşıntıdır. DHF kendini damar permeabilitesinde artma, trombositopeni ve hemorajilerde artma ile belli ederken, DSS intersitisyel alanlara sıvı akışı ve bunun sonucunda meydana gelen hipovolemik şok ve ölümlerle karakterizedir. DENV 'ye bağlı fark edilebilen hastalıkların miktarı bir buzdağına benzetilmektedir. Tüm Deng virus enfeksiyonların yaklaşık %50-90'ı asemptomatik seyrederken (BALMASEDA ve ark., 2006), klinik enfeksiyonların oranı sadece %10 civarındadır (WHO, 2000) (Şekil 2).



Şekil 2: DENV enfeksiyonu piramidi: Tüm dünyada yılda yaklaşık 100 milyon enfeksiyon meydana geldiği tahmin edilen enfeksiyonun sadece %10 kadarı semptomatik ve rapor edilen enfeksiyonlardır (KYLE ve HARIS, 2008).

Sonuç

Son yıllarda, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de arbovirus enfeksiyonların görülme sıklığı artmıştır. Her geçen gün insanlarda rapor edilen vakaların sayısı çoğalmaktadır. Buna ek olarak, hayvanlarda ciddi ekonomik kayıplara sebep olan enfeksiyonlar meydana getirmekte ve bu durumun ağır sosyoekonomik yansımaları olmaktadır. Global iklim değişiklikleri, virusun taşıyıcısı olan eklem bacaklıların yaşam alanını değiştirmekte ve geliştirmektedir. Buna bağlı olarak, arbovirusların yayılımı da tüm dünyada artan bir şekilde tehlike arz etmektedir. Tehlikenin esas boyutu, bu hastalıkların çoğuna karşı etkili bir aşı veya tedavi geliştirilememesi, son konaklar arasında virus naklinin mümkün olması ve bazen insanlarda ölümle sonuçlanmasıdır.

Arboviral enfeksiyonlar tüm dünyada “Tehlike arz eden yeni viruslar” olarak tanımlanmaktadır. Pek çok ülke bu virusların sınırlarına giriş yollarını araştırmakta, erken uyarı sistemleri ile önlem almaya çalışırken, bir yandan da etkili aşı ve tedavi geliştirme çalışmaları yapmaktadır. Ülkemizde meydana gelen vakaların, ekonomik kayıpların ve ölümlerin sayısının artmaması için bu viruslarla ilgili daha fazla araştırmaya ve bilince ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. **Adam I, Karsany M.S.**, (2008). *Case Report: Rift Valley Fever With Vertical Transmission in A Pregnant Sudanese Woman*. J Med Virol. May 80 (5), 929
2. **Balmaseda A, Hammond Sn, Tellez Y, Imhoff L, Rodriguez Y**, (2006). *High Seroprevalence Of Antibodies Against Dengue Virus in A Prospective Study Of Schoolchildren in Managua, Nicaragua*. Trop Med Int Health. 11:935-42.
3. **Bréard E, Sailleau C, Coupier H, Mure-Ravaud K, Hammoumi S, Gicquel B, Hamblin C, Dubourget P, Zientara S**, (2003). *Comparison Of Genome Segments 2, 7 And 10 Of Bluetongue Viruses Serotype 2 For Differentiation Between Field Isolates And The Vaccine Strain*. Vet Res 34: 777-89.
4. **Buckley A, Dawson A, Gould E.A.**, (2006) *Detection Of Seroconversion To West Nile Virus, Usutu Virus And Sindbis Virus in Uk Sentinel Chickens*. Virol J. 3, 71.
5. **Burke D.S, Monath T.P. Flaviviruses**. in: **Knipe D.M, Howley P.M**, (2001) (Eds.), *Fields Virology*, Fourth Ed. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, Pp. 1043-1125.
6. **Casals J, Henderson Be, Hoogstraal H, Johnson Km, Shelokov A**, (1969) *A Review Of Soviet Viral Hemorrhagic Fevers*, J Infect Dis 122, 437-53.
7. **Casals J**,(1969). *Antigenic Similarity Between The Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever And Congo Virus*. Proc Soc Exp Biol Med. 131, 233-36.
8. **Coffey L, Vasilakis N, Brault C, Powers A.M, Tripet F, Weaver C**, (2008). *Arbovirus Evolution in Vivo is Constrained by Host Alternation*. Pnas. May 13; Vol. 105, 6970-675.
9. **Erasmus, B. J**, (1990). *Bluetongue Virus*. in: *Virus Infections Of Ruminants*, Ed: Dinter, Z., Morein, B., Elsevier Science Publishers, Chapter 21, P.: 227-237.
10. **Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H**, (2004) *The Characteristics Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in A Recent Outbreak in Turkey And The Impact Of Oral Ribavirin Therapy*. Clin Infect Dis; 39, 285-89.
11. **Ergonul O**, (2006) *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. Lancet Infect Dis. 6, 203-214.
12. **Ertürk A, Tatar N, Kabaklı O, Incoglu S, Cizmeci S.G, Barut F.M**, (2004). *The Current Situation Of Bluetongue in Turkey*. Vet Ital. 40 (3), 137-140.
13. **Figueiredo L.T.M**, (2007). *Emergent Arboviruses in Brazil*. Medicina Tropical 40(2):224-229.
14. **Flint S.J, Enguist L.W, Racaniello V.R, Skalla A.M**, (2004). *Principles Of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, And Control Of Animal Viruses*. 2nd Edition. Asm Press. App.A: 803-871.
15. **Gaydos J.k, Crum J.m, Davidson W, Cross S, Stallknecht D**, (2004). *Epizootiology Of An Epizootic Hemorrhagic Disease Outbreak in West Virginia*. Wildl Dis. Jul;40(3):383-93.
16. **Gear J.H**, (1982). *The Hemorrhagic Fevers Of Southern Africa With Special Reference To Studies in The South African Institute For Medical Research*. Yale J Biol Med. May-Aug;55(3-4):207-12.
17. **Girard Y.A, Klingler K.A, Higgs S**, (2004) *West Nile Virus Dissemination And Tissue Tropisms in Orally Infected Culex Pipiens Quinquefasciatus*. Vector Borne Zoonotic Dis 4: 109-122
18. **Goddard L.B, Roth A.E, Reisen W.K, Scott T.W**, (2002) *Vector Competence Of California Mosquitoes For West Nile Virus*. Emerg Infect Dis 8: 1385-1391
19. **Gould E.A, Higgs S, Buckley A, Gritsun T.S**, (2006) *Potential Arbovirus Emergence and Implications For The United Kingdom*. Emerg Infect Dis.; 12 (4): 549-55
20. **Gould E.A., Higgs S**, (2008). *Impact Of Climate Change And Other Factors On Emerging Arbovirus Diseases*. Trans R Soc Trop Med Hyg. Baskıda.
21. **Gubler D.J**, (2002). *The Global Emergence/Resurgence Of Arboviral Diseases As Public Health Problems*. Arch Med Res. Jul-Aug;33(4):330-42.
22. **Harvala H, Bremner J, Kealey S, Weller B, Mclellan S, Lloyd G, Staples E, Faggian F, Solomon T**,(2008). *Case Report: Eastern Equine Encephalitis Virus Imported To The Uk*. J Med Virol. Feb;81(2):305-8.

23. **Heinz, F.X, Collett M.S, Purcell R.H, Gould E.A, Howard C.R, Houghton M, Moormann R.J.M, Rice C.M, Thiel H.J,** (2000). Family Flaviviridae. In: Van Regenmortel, C.M., Fauquet, C.M., Et Al.(Eds.), Virus Taxonomy. 7th Report Of The International Committee For The Taxonomy Of Viruses. Academic Press, San Diego, Pp. 859–878.
24. **Hoogstraal H,** (1979) *The Epidemiology Of Tick Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever In Asia, Europe, And Africa.* J Med Entomol; 15: 307–417.
25. **Hsieh Yc, Chen Sh, Chou Cc, Ting Lj, Itakura C, Wang F,** (2005). *Bovine Ephemeral Fever In Taiwan (2001-2002).* Vet Med Sci. Apr;67(4):411-6.
26. **Karti S.S, Odabasi Z, Kortzen V,** (2004). *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey.* Emerg Infect Dis; 19: 1379–84.
27. **Kuno G, Chang J,** (2005). *Biological Transmission Of Arboviruses: Reexamination Of And New Insights into Components, Mechanisms, And Unique Traits As Well As Their Evolutionary Trends.* Clinical Microbiology Reviews. 18(4): 608-637.
28. **Kunz C,** (2003). *The Vaccination And The Austrian Experience.* Vaccine 21 (Suppl. 1), S50–S55.
29. **Kyle J.L, Haris E,** (2008) *Global Spread And Persistence Of Dengue.* Annu.Rev. Microbiol. 62: 71-92
30. **Lanciotti R.S,** (1999): *Origin Of The West Nile Virus Responsible For An Outbreak Of Encephalitis in The Northeastern United States.* Science; 286; 2333-37
31. **Letchworth G.j, Rodriguez L.i, Del Cbarrera J,** (1999). *Vesicular Stomatitis.* Vet J. May;157(3):239-60.
32. **Linthicum, K.J, Anyamba A, Tucker C.J, Kelley P.W, Myers M.F, Peters C.J,** (1999). *Climate And Satellite Indicators To Forecast Rift Valley Fever Epidemics in Kenya,* Science 285, Pp. 397–400.
33. **Luting S, Olchevsky U, Ben-Nathan D, Lachmi B.E, Malkinson M, Kobiler D, Halevy M,** (2000). *A Live Attenuated West Nile Virus Strain As A Potential Veterinary Vaccine.* Viral Immunol. 13: 401-410
34. **Mandl C.W,** (2005) *Steps Of The Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Cycle That Affect Neuropathogenesis.* Virus Research 111; 161-174.
35. **Mead, D.G, Ramberg F.B, Besselsen D.G, Mare C.J,** (2000). *Transmission Of Vesicular Stomatitis Virus From Infected To Noninfected Black Flies Co-Feeding On Nonviremic Deer Mice.* Science 287, 485–487.
36. **Mellor P.S, Wittmann E.J,** (2002). *Bluetongue Virus in The Mediterranean Basin 1998-2001.* Vet J 164(1): 20-37.
37. **Mertens, P, Mann N, Prasad G, Samuel A.R, Shaw, A.E, Potgieter A.C, Anthony S.J, Mann S,** (2007). *Design Of Primers And Use Of Rt-Pcr Assays Fortyping European Bluetongue Virus Isolates: Differentiation Of Field And Vaccine Strains.* J.Gen. Virol. 88:2811-23.
38. **Murphy M.D, Howerth EW, Maclachlan NJ, Stallknecht DE,** (2005). *Genetic Variation Among Epizootic Hemorrhagic Disease Viruses in The Southeastern United States: 1978-2001.* Infect Genet Evol. Mar;5(2):157-65.
39. **Murphy F.A, Gibbs J.E.P, Horzineck C.M, Studdent M.J,** (1999). *Veterinary Virology,* 3th Edition, Raven Press Ltd. Nev York.1999.
40. **Novella I.S, Ebendick-Corpus B.E, Zárate S, Miller E.L,** (2007). *Emergence Of Mammalian Cell-Adapted Vesicular Stomatitis Virus From Persistent Infections Of Insect Vector Cells.* J Virol. Jun;81(12):6664-8.
41. **Novella S, Ebendick-Corpus E, Za’Rate S, Miller L,** (2007). *Emergence Of Mammalian Cell-Adapted Vesicular Stomatitis Virus From Persistent Infections Of Insect Vector Cells.* J. Virol.81(12), 6664-6668.
42. **Nuttall P.A, Labuda M,** (2003). *Dynamics Of Infection in Tick Vectors And At The Tick–Host Interface.* Adv. Virus Res. 60, 233–272.
43. **Ohashi S, Yoshida K, Yanase T, Tsuda T,** (2002). *Analysis Of Intratypic Variation Evident in An Ibaraki Virus Strain And its Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serogroup.* Clin. Microiol. Oct;40(10):3684-8
44. **Ozkul A, Yıldırım Y, Pınar D, Akcalı A, Yılmaz V, Colak D,** (2006): *Serological Evidence Of West Nile Virus (Wnv) in Mammalian Species in Turkey*
45. **Paessler S, Ni H, Petrakova O, Fayzulın R.Z, Yun N, Anishchenko M, Weaver S.C, Frolov I,** (2006). *Replication And Clearance Of Venezuelan Equine Encephalitis Virus From The Brains Of Animals Vaccinated With Chimeric Sn/Vee Viruses.* J Virol. Mar;80(6):2784-96.
46. **Parreira R, Severino P, Freitas F, Piedade J, Almeida A.P, Esteves A,** (2007) *Two Distinct Introductions Of The West Nile Virus in Portugal Disclosed By Phylogenetic Analysis Of Genomic Sequences.* Vector Borne Zoonotic Dis 7, Pp. 344–352.
47. **Pittman P.R, Liu C.T, Cannon T.L, Makuch R.S, Mangiafico J.A, Gibbs P.H, Peters CJ,** (1999) *Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience.* Vaccine. Aug 20;18(1-2):181-9.
48. **Rodríguez LI,** (2002). *Emergence And Re-Emergence Of Vesicular Stomatitis in The United States.* Virus Res. May 10;85(2):211-9. Review.
49. **Sağlık Bakanlığı,** Türkiye. 2005. *Bulaşıcı Hastalıklar Bölümü Raporu, Ankara.*
50. **Savina G, Maclachlanb N.J, Sanchez-Vizcainoc J.M, Zientarad S,** (2008). *Vaccines Against Bluetongue in Europe.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Mar;31(2-3):101-20.
51. **Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S,** (2008). *Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity.* Vet Res. Sep-Oct;39(5):46. Baskıda.

52. **Simpson D.I.H, Knight E.M, Courtois G, Williams M.C, Weinbern M.P, Kibukamusoke J.W**, (1967). *Congo Virus: A Hitherto Undescribed Virus Occuring in Africa. Human Isolations-Clinical Notes*. East Afr Med J; 44: 87
53. **Walker P.J**, (2005). *Bovine Ephemeral Fever in Australia And The World*. Curr Top Microbiol Immunol.;292:57-80.
54. **Watts D.M, Ksiazek T.G, Linthicum K.I, Hoogstraal H**, (1988): *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. in: *Monath Tp, Ed. The Arboviruses: Epidemiology And Ecology*, Volume 2. Boca Raton, FL,Usa: Crc Press, 177–260.
55. **Watts D.M, Ussery M.A, Nash D, Peters C.J**, (1989). *Inhibition Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Viral Infectivity Yields in Vitro By Ribavirin*. Am J Trop Med Hyg; 41: 581–85.
56. **Weaver S, Hagenbaugh A, Bellew L, Gousset L, Mallampalli V, Holland J, Scott T**, (1994). *Evolution Of Alphaviruses in The Eastern Equine Encephalomyelitis Complex*. J Virol. 68:158-69.
57. **Weaver S.C, Barrett D.T**, (2004); *Transmission Cycles, Host Range, Evolution And Emergence Of Arboviral Disease* Nature Reviews Microbiology; 2; 789-801.
58. **Weaver S.C, Barrett A.D.T**, (2004). *Transmission Ycls, Host Cyces, Host Range, Evulation And Emergence Of Arboviruses*. Nature Reviews. Microbiology Vol.2. 789-801.
59. **Whitehouse C.A**, (2004) *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. Antivir Res.; 64: 145–60.
60. **WHO**, (2000). *Strengthening Implementation Of The Global Strategy For Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever Prevention And Control*. Presented At Report Of The Informal Consultation, Geneva, Switzerland.
61. **Wittmann, E, Mellor P, Baylis M**, (2001). *Using Climate Data To Map The Potential Distribution Of Culicoides Imicola (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe*. Rev Sci Tech. Dec;20(3):731-40.
62. **Yonguç A.D, Taylor W.P, Csontos L, Worrall E**, (1982). *Bluetongue in Western Turkey*. Vet. Rec. Aug. 111: 144-46.

Kanatlı *Salmonella* Aşılarına Farklı Perspektiften Bakış

Elçin GÜNAYDIN¹

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara, Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara

Özet: *Salmonella* infeksiyonlarından korunmada aşılama oldukça güçlü bir araçtır. Daha etkili ve daha güvenli *Salmonella* aşılarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. *Salmonella* virulensinin genetiği hakkında elde edilen bilgiler ve modern rekombinant DNA teknolojisi; çoklu, belirlenmiş, attenüe ve irreversible mutasyonların bakteri genomu içerisine dahil edilmesi gerekliliği üzerinde durmaktadır. Bu genler bakteriyel yapısal komponentlerin (Lipopolisakarit; LPS, dış membran proteini; outer membran proteini, OMP) veya temel metabolitlerin (aromatik aminoasit, purin, primidinhistidin) biyosentezinden sorumlu olan 'house-keeping genes' olarak adlandırılan genlerdir. *Salmonella*'nın konak içinde hayatta kalabilmesini sağlayan çok sayıda gen identifiye edilmiştir. Bu genlerde meydana getirilen mutasyonlarla yeni aşı suşları denenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Salmonella*, mutasyon, aşı suşu.

View at Poultry *Salmonella* Vaccines with Different Perspective

Abstract: Vaccination is a powerful tool for the protection of *Salmonella* infections. There is a need to develop more effective and more reliable *Salmonella* vaccines. The knowledge achieved about the genetics of *Salmonella* virulence and modern recombinant DNA technology dwell upon a subject of the necessity of inserting multiple, specified, attenuated and irreversible mutations into the bacterial genome. These genes, responsible for biosynthesis of bacterial basic structural components (Lipopolisaccharide; LPS, outer membran protein; OMP) or basic metabolites (aromatic aminoasit, purin, primidinhistidin) are termed as house-keeping genes. Many genes, eliciting survival of *Salmonella* into the host were identified. New vaccine strains were experienced by the mutations achieved in the genes.

Key words: *Salmonella*, mutation, vaccine strain.

Giriş

Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonlarına neden olan *Salmonella* serovarıları konakçı-bağımlı ve konakçı-bağımsız serovarlara olmak üzere 2 başlık altında değerlendirilir. Kanatlılarda, *Salmonella* infeksiyonlarına karşı etkili koruyucu önlemlerin alınması öncelikle *Salmonella* salgınlarının izlerini sürmekle başarılıdır. İngiltere ve Kuzey Amerika'da *Salmonella* insidensinin rapor edildiği dökümanlar 1930'lu yıllarda başlamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1935 yılında *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum (*Salmonella* Pullorum) infeksiyon düzeyini azaltmak için oluşturulan 'Ulusal Kanatlı Koruma Programı' boyalı antijenle aglutinasyon ve tam kan testi kanatlı sürülerinde isteğe bağımlı olarak geniş kapsamlı olarak kullanılmıştır (BÄUMLER ve ark., 2000). Eş zamanlı olarak, kimi Avrupa ülkelerinde de benzer koruma kontrol programları uygulanmıştır. 'Ulusal Kanatlı koruma Programı 1954 yılında Kanatlı Tifosu etkeni olan *Salmonella* Gallinarum'u da içine alacak şekilde değiştirilmiştir. Bu iki *Salmonella* biyotipi (Pullorum ve Gallinarum) aynı

serovara ait oldukları için *Salmonella* Pullorum pozitif hayvanların imhası tifo insidensini de etkin bir biçimde düşürmüştür. Böylelikle 1960-1970'li yıllarda *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum İngiltere ve ABD'de ticari kanatlı sürülerinden elimine edilmiştir. 1900'lerin başında, insan *Salmonella* Enteritidis infeksiyonları kanatlılarla ilişkilendirilmemiş, bu patojenin tek bilinen hayvan rezervuarının rodentler olduğu düşünülmüştür (BÄUMLER ve ark., 2000; WOLFGANG ve ark., 2000). 1930'larda monitoring çalışmaları başladığında etkenin ortaya konulamaması ve kanatlıların 1960'lı yıllara dek bu mikroorganizma ile infekte olmaması, bu hipotezin çok geçmeden çürütülmesine neden olmuştur. Epidemiyolojik araştırmaların retrospektif analizlerinden ortaya çıkan sonuçlar *Salmonella* Enteritidis'in neden olduğu insan salmonellosis epidemilerinin, avian *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum'un boşalttığı ekolojik boşluğu *Salmonella* Enteritidis'in doldurması sonucu şekillendiğini göstermiştir (BÄUMLER ve ark., 2000; WOLFGANG ve ark., 2000). Retrospektif analizler *Salmonella*

Enteritidis'in kanatlı sürülerine girişinin 1960'larda olduğunu ve bunun evcil kanatlılarda konakçı-bağımlı *Salmonella* patojenlerinin eradikasyonu ile çakıştığını ortaya koymaktadır. Her üç patojen ortak immunodominant yüzey antijenini paylaştığı ve dolayısıyla aynı serogrupta yer aldıkları için iki konakçı-bağımlı *Salmonella* serovarına karşı oluşan sürü immunitesi, geçtiğimiz yüzyılın ikinci yarısında *Salmonella* Enteritidis'in kanatlı sürülerindeki sirkülasyonunu engellemiştir. Bu nedendir ki; serogrup B'de yer alan *Salmonella* Typhimurium uygulanan koruma ve kontrol programlarından etkilanmemiş ve stabil bir insidensle seyretmiştir (BÄUMLER ve ark., 2000; WOLFGANG ve ark., 2000).

Salmonella infeksiyonlarının kontrolünde, etkili ve güvenilir *Salmonella* aşılarının kullanımı yönünde duyulan ihtiyaç, araştırmacıları farklı aşı suşları üzerinde çalışmaya yöneltmektedir. Virulens genlerinde oluşturulan mutasyonlarla geliştirilen aşı suşlarıyla ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (MASTROENI ve ark., 2000). Burada halihazırda kullanılan ve halen araştırmaları devam eden mutasyona uğratılmış bazı aşı suşları hakkında bilgi verilecektir.

9 R Suşu: Belirlenmemiş mutant suş *Salmonella* Gallinarum 9R'nın tavukları virulent *Salmonella* Gallinarum ve *Salmonella* Enteritidis'e karşı koruyabildiği bilinmektedir (SMITH 1956; BARROW 1991). Fakat aşı bazı tavuk ırklarında dalakta lezyonlara ve hepatitise yol açmakta ve *Salmonella* Typhimurium'a karşı koruma sağlamamaktadır (SILVA ve ark., 1981). *Salmonella* Gallinarum 9R suşu 1950'lerden beri tavuklarda canlı aşı olarak kullanılmaktadır. 9R kanatlı tifo aşısı, besinsel kalitesi düşük bir besiyerinde pasajlar yapılarak üretilmiş ve ergin tavuklarda sistemik infeksiyona karşı güçlü bir koruma sağlamıştır. 9R suşu rough bir suş olup, direkt lipopolisakkarite karşı antikor üretimini stimüle etmemektedir. Aşı suşunun bu özelliği oldukça değerlidir. Çünkü *Salmonella* enfeksiyonunun tespitinde kullanılan serotip-spesifik serum IgG varlığına dayalı serolojik testlerle interfere olmamaktadır (ZHANG-BARBER ve ark., 1999).

Dış membran proteini (Outer membran protein; Omp): OmpR regülatör sistemin bir komponentidir. OmpR temel outer membran proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu regüle

eder. Bu operon, serbest yaşam alanlarında ve hayvan barsağında *Salmonella*'nın farklı çevresel koşullara adaptasyonunu sağlar (MASTROENI ve ark., 2000). *Salmonella* Enteritidis'in infeksiyon oluşturabilmesi intestinal epiteliyal hücrelere tutunma, kolonizasyon ve invazyon yeteneğine bağlıdır. Tutunma patogenesisin birinci basamağıdır. Bakterinin tutunması kollektif olarak adhesin olarak bilinen proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu safhanın blokajı bakteriyel infeksiyonu engellemenin en etkili stratejisidir (KHAN ve ark., 2003). *Salmonella* Enteritidis'in outer membran proteinleri adjuvant ile aşı olarak kullanıldıklarında, virulent *Salmonella* suşlarına maruz bırakılan tavuklardan alınan kloakal svaplardan yapılan ölçümlerde dışkı ile saçılımın engellendiği ve yüksek antikor cevabının şekillendiği ortaya konmuştur (MEENAKSHI ve ark., 1999).

Galactose epimerase-less (galE) mutantları: Gal E mutantları, uridine diphosphate-galactose (UDP-Gal) epimerase (galE) enziminin eksikliğinden dolayı, uridine-diphosphate-glucose (UDP-Gul)'dan UDP-Gal'ı sentezleyemezler. Galaktoz, Lipopolisakkaritin ve bazı *Salmonella* serotiplerinde O-polisakkarit yan zincirinin bir komponentidir. Sonuç olarak, galE suşları galaktoz yokluğunda rough koloniler şeklinde ürerler. Eksojen olarak galaktoz sağlandığında; Salmonellalar, galactokinase ve galactose 1-P uridyl transferase enzimini kullanarak LPS molekülü içine şeker dahil ederek smooth LPS sentezleyebilirler ve bu sayede son ürün UDP-Gal oluştururlar. Fakat galE yokluğu, azalan virulensle sonuçlanan ve hücreler için toksik olan Gal-1-P ve UDP-Gal birikimine neden olmaktadır (MASTROENI ve ark., 2000). *Salmonella* Typhimurium'un canlı galE mutantları ile oral yolla aşılana ve 14 gün sonra oral yolla *Salmonella* Typhimurium'a maruz bırakılan 1 günlük civcivlerde fekal saçılımın azaldığı, kümeslerden ve kesimhanelerden alınan çevresel örneklerde *Salmonella* taşıyıcılık düzeyindeki düşüşün dikkate değer olduğu bildirilmiştir. Bu aşının, tavukların canlı ağırlık kazanımında da önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (WRAY ve ark., 1983).

Adenylate cyclase (Cya) ve cyclic AMP reseptör (crp) mutantları: Cya ve crp genleri; hücre yüzeyi OMP, flagella ve fimbriyanın ekspresyonunda, karbonhidrat ve aminoasitlerin transportunda ve kullanımında görev alan çok sayıda ve çe-

şitlilikteki genin ekspresyonunu regüle eder (MASTROENI ve ark., 2000). *Salmonella* Tyhimurium suşunun cya- crp mutantları ile oral immunizasyon, aşıtlı tavuklarda antikör yanıtını (IgA, IgG, IgM) ve hücrel immun yanıtı indüklemektedir (MASTROENI ve ark., 2000). Canlı attenüe cya-crp mutantları ile yapılan çalışmalarda, homolog ve heterelog suşlarla tavuklar karşı karşıya bırakıldığında tavukların gastrointestinal sisteminde visseral kolonizasyonun ve invazyonun azaldığını ortaya konmuştur. Ayrıca bu aşı yumurta üretimine herhangi bir etki yapmaksızın en az 11 ay kadar virulent homolog ve heterelog *Salmonella* suşlarının intestinal, visseral, reprodüktif ve yumurta kolonizasyonuna karşı koruma sağlamaktadır (HASSAN ve CURTIS 1994, 1997).

Aromatik bağımlı aşılarda: *Salmonella* aromatik (aro) biyosentetik yolun final ürününden para-amino-benzoic-acid (PABA) ve 2,3-dihydroxybenzoate (DHB) sentezler. Aro genlerinde mutasyon oluşturulan Salmonellalar, kültürleri yapılan makrofajlarda, memeli dokularında üreme kabiliyetlerini yitirmiştir ve birçok hayvan türü için etkili aşılardır (HOISETH ve STOCKER, 1981; FIELDS ve ark., 1986). Canlı attenüe *Salmonella* suşları, neonatal civcivlerin normal barsak mikroflorası olmadığı için, bu hayvanların alimantar bölgesine kolonize olabilmektedir. Bu durum, yaşamın ilk günleri içerisinde virulent *Salmonella* suşlarının kolonizasyonunu engellemektedir. Bu fenomene kolonizasyon-inhibisyon adı verilmektedir (BARROW ve ark., 1987; BERCHIERI ve BARROW 1990). Bu inhibitör fenomenin test edilen tüm *Salmonella* suşlarında gözlenmediği rapor edilmiştir. Bir diğer hipotez ise kullanılabilir karbon kaynakları ve elektron akseptörlerinin olmaması dolayısıyla ikinci suşun suprese olmasıdır (ZHANG-BARBER ve ark., 1997; VAN IMMERSSEL ve ark., 2002). *Salmonella* Enteritidis'in Aro mutantları kuluçkadan yeni çıkan civcivlerde ve ergin tavuklarda oldukça güvenlidir. Kuluçkadan yeni çıkan civcivlerin oral yolla aşılama sonucunda sekumda bakteri sayısında çok fazla artış olmasına rağmen, immunizasyondan bir gün sonra herhangi bir yan etkiye rastlanmadığı ve infeksiyona karşı direnç sağlandığı ortaya konmuştur (COOPER ve ark., 1992, 1994). Intramuskuler aşılama yapmadan, sadece oral aşılama sonrasında genç tavuklar virulent suşa oral ve intramuskuler olarak maruz bırakıldık-

larında bakteriyel saçılımın önemli ölçüde azaldığı ve dalak, karaciğer, ovaryum ve sekumda kolonizasyonun kaydadeğer bir şekilde gerilediği gözlenmiştir (COOPER ve ark., 1992, 1994). Oral ve intramuskuler aşı kombinasyonunun uygulaması sonrasında, genç tavuklar oral yolla *Salmonella* Enteritidis'e maruz bırakıldığında ovaryumlarda artan bir korumanın sağlandığı bildirilmiştir (BARROW ve ark., 1990). Aynı zamanda aro mutantları ile aşılama, aşıtlı tavuklara infekte tavuklardan wild-type salmonellaların geçişini engellemektedir (COOPER ve ark., 1993). *Salmonella* Gallinarum aro mutanı ile oral aşılama yapmadan sadece intramuskuler aşılama, tavukları virulent suşla oral maruz bırakılışa karşı korumaktadır. *Salmonella* Enteritidis rough aro mutantları ile immunizasyon, oral yolla virulent *Salmonella* Enteritidis'e maruz bırakılan tavuklarda zayıf koruma sağlar. Bunun sebebi henüz açıklığa kavuşmamakla birlikte rough aşı suşunun anti-O antikör oluşturmadaki yetersizliği olduğu düşünülmektedir (VAN IMMERSSEL ve ark., 2002).

DNA adenine methylase (Dam) mutantları: DNA metilasyonunun değiştirilmesine dayalı aşılarda, kanatlılarda ön *Salmonella* kontaminasyonunu azaltarak, insanlara gıda ile bulaşabilen bu patojenin potansiyel tehdit olmasını engelleyebilmektedir. DNA metilasyonu, Salmonellaları içine alan proteobakterlerin gamma alt grubundaki çok sayıda patojenin virulensinde rol alır. Virulente DNA metilasyonunun etkinliği ve koruyucu immun cevap oluşturmada, gen ekspresyonunda global regülatör olarak görev yapma kapasitesinin bir neticesidir (HEITHOFF ve ark., 1999; LOW ve ark., 2001; MAHAN ve LOW, 2001). DNA adenine methylase, *Escherichia coli* (VAN DER WOUDE ve ark., 1996) ve *Salmonella* spp.'de (NICHOLSON ve LOW, 2000) çok sayıda adhezinin üretimini ve *Salmonella* infeksiyonun şekillenmesi için gerekli olan birçok virulens geninin regülasyonunu üstlenmektedir. Bu tarz ektopik gen ekspresyonları, aşıtlı hayvanlarda görülen ve etkili immunitiyi şekillendiren çok sayıda ve çeşitlilikte antijenin üretimi ile sonuçlanabilmektedir (HEITHOFF ve ark., 1999, 2001). Bu nedenle dam aktivasyonunun denetim dışı bırakılmasının, birçok hayvanı infekte eden farklı patojenlere karşı koruyucu immun cevabı ortaya çıkarmanın bir yolu olduğu bildirilmektedir (LOW ve ark., 2001; MAHAN ve LOW, 2001). DUEGER ve

ark., (2001) 15'li gruplar halinde 30 adet kuluçkadan yeni çıkan civcivle yaptıkları çalışmada, Dam-*Salmonella* Typhimurium UK-1'e maruz bıraktıkları I. Grubun yaşadığını, II. Gruba ise Dam artı *Salmonella* Typhimurium UK-1 verdiklerinde 15 civcivden 8'inin öldüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda Dam'da oluşturulan mutasyonun *Salmonella* Typhimurium UK-1'i attenüe ettiği ortaya konmuştur. Aynı araştırmacılar Dam-*Salmonella* Typhimurium UK-1 ile aşıladıkları civcivleri *Salmonella* Typhimurium F98'e maruz bıraktıklarında, aşılı hayvanların dalak, karaciğer, bursa Fabricius, ileum, sekum ve dışkılarından yaptıkları incelemelerde *Salmonella* Typhimurium F98'e rastlamadıklarını, aşılanmayan hayvanlarda ise bu organlarda etkeni izole ettiklerini bildirirken, homolog suşa karşı koruma sağlandığını belgelemişlerdir (DUEGER ve ark., 2001).

Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase (nuoG) mutantları: Bu mutant suşla attenüasyonun mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamış olmasına rağmen; nuoG mutantlarının tek karbon kaynağı olan asetatta çok zayıf üredikleri bilinmektedir (ARCHER ve ark., 1996). NADH dehydrogenase I kompleksi, elektron transport zincirinin ilk komponentidir. Nuo mutantlarının fermente edilemeyen karbon kaynaklarından enerji ekstrete etmede wild-type suşlara göre daha az etkin olmaları attenüasyonun bir sebebi olarak gösterilmektedir. NADH dehydrogenase-I'de nuoG mutasyonu, sekumda kolonizasyonunun azalması, dalak ve karaciğerde bakteri üremesinin durmasıyla virulent *Salmonella* Gallinarum suşunu oldukça attenüe eder. Canlı nuoG mutantı ile tek doz oral immunizasyon sonrasında, virulent *Salmonella* Gallinarum'a maruz bırakılan 2 haftalık piliçlerde mortalitenin % 75'ten % 8'in altına düştüğü bildirilmiştir (ZHANG-BARBER ve ark., 1998).

Sıcaklık Duyarlı (Temperature sensitive -Ts) mutantlar: Fareler virulent *Salmonella* suşlarına oral veya intravenöz maruz bırakıldıklarında, Ts *Salmonella* suşları ile immunizasyonun, *Salmonella* antikorları ve antikor salgılayan hücrelerin sayılarında artışa yol açtığı bildirilmiştir. Ts mutantları farelerde subkutanöz olarak üreyebilmekte ve septik arthritise neden olabilmektedir. Bu bulgular; mutant suşun düşük ısının bulunduğu vücut alanlarında potansiyel üreme gösterebildiğinin delili niteliğindedir (MASTROENI ve ark., 2000). Cerquetti ve

Gherardi (2000), tavukları *Salmonella* Enteritidis E/1/3/ Ts mutantının multiple oral dozlarına maruz bıraktıkları çalışmalarında, herhangi bir hastalık tablosuna rastlamamakla birlikte sekal kolonizasyonda azalma olduğunu ve virulent *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Gallinarum'a karşı korunmanın sağlandığını ortaya koymuşlardır.

Sonuç olarak, çoklu, belirlenmiş, attenüe ve irreversible mutasyonların bakteri genomu içerisine dahil edilmesi sonucu geliştirilen aşı suşlarıyla kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonlarından korunmada anlamlı sonuçlar alınmakla beraber konuyla ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Kaynak

1. Barrow P. (1991). *Serological analysis for antibodies to Salmonella enteritidis*. Vet Rec. 128(2), 43-4.
2. Barrow PA, Hassan JO, Lovell MA, Berchieri A, (1990). *Vaccination of chickens with aroA and other mutants of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis*. Res Microbiol. 141(7-8), 851-853.
3. Barrow PA, Tucker JF, Simpson JM, (1987). *Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with Salmonella Typhimurium gram-negative facultatively anaerobic bacteria*. Epidemiol Infect. 98, 311-22.
4. Bäuml AJ, Hargis BM and Tsoilis RM, (2000). *Tracing Origins of Salmonella outbreaks*. Science. 287, 50-52.
5. Berchieri JRA, Barrow PA. (1990). *Further studies on the inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with Salmonella Typhimurium by pre-colonization with an avirulent mutant*. Epidemiol Infect. 104 (3), 427-41.
6. Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE, (1992). *Vaccination of chickens with chicken-derived Salmonella enteritidis phage type 4 aroA live oral Salmonella vaccines*. Vaccine.10(4), 247-254.
7. Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE, (1993). *Further studies of the application of live Salmonella enteritidis aroA vaccines in chickens*. Vet Rec. 133(2), 31-36.
8. Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE, (1994). *Invasiveness and persistence of Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, and a genetically defined Salmonella enteritidis aroA strain in young chickens*. Infect Immun. 62(11), 4739-46.
9. Dueger EL, House JK, Heithoff DM, Mahan MJ, (2001). *Salmonella DNA Adenine methylase Mutants Elicit Protective Immune Responses to Homologous and Heterologous Serovars in Chickens*. Infection and Immunity 69(12), 7950-7954.
10. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F, (1986). *Mutants of Salmonella typhimurium that can not survive within the macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci. U S A. 83(14), 5189-93.

11. **Hassan JO, Curtiss III R**, (1994). *Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent Salmonella typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous Salmonella serotypes*. Infect Immun. 62(12), 5519-5527.
12. **Hassan JO and R. Curtiss III**, (1997). *Efficiency of a live avirulent Salmonella typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 41, 783-791.
13. **Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ**, (1999). *An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence*. Science. 284, 967-970.
14. **Heithoff DM, Enuioutina EY, Daynes RA, Sinsheimer DA, Low DA, Mahan MJ**, (2001). *Salmonella DNA adenine methylase mutants confer cross-protective immunity*. Infect. Immun. 69, 6725-6730.
15. **Hoiseth SK and Stocker BA**, (1981). *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines*. Nature. 291, 238-9.
16. **Khan MI, Fadl AA, Venkitanarayanan KS**, (2003). *Reducing colonization of Salmonella Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins*. Journal of Applied Microbiology. 95, 142-145.
17. **Low DA, Weyand NJ, Mahan MJ**, (2001). *The roles of DNA methylation in the control of bacterial gene expression and virulence*. Infect. Immun. 69, 7197-7204.
18. **Mahan MJ, Low DA**, (2001). *DNA methylation regulates bacterial gene expression and virulence*. ASM News 67, 1-7.
19. **Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G**, (2000). *Salmonella: Immune responses and vaccines*. The Veterinary Journal. 161, 132-164.
20. **Meenakshi M, Bakshi CS, Butchaiah G, Bansal MP, Siddiqui MZ, Singh VP**, (1999). *Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with Salmonella enteritidis*. Vet Res Commun. 23(2), 81-90.
21. **Nicholson B, Low DA**, (2000). *DNA methylation-dependent regulation of pef expression in Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 35, 728-742.
22. **Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF**, (1981). *Studies on the use of 9R strain of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens*. Avian Dis. 25(1), 38-52.
23. **Smith H.W.** (1956). *The use of live vaccines in experimental Salmonella gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect*. J Hyg (Lond). 54(3), 419-32.
24. **van Immerseel F, de Buck Jeroen, de Smet I, Mast J, Haesebrouck F, Du Catelle R**, (2002). *The effect of vaccination with a Salmonella Enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens*. Vaccine. 20, 3034-3041.
25. **van der Woude M, Braaten B, Low D**, (1996). *Epigenetic phase variation of thr pap operon in Escherichia coli*. Trends Microbiol. 4, 5-9.
26. **Wolfgang R, Hargis BM, Tsois RM, Kingsley RA, Hinz KH, Tschäpe H. and Bäumlner AJ**, (2000). *Competitive Exclusion of Salmonella Enteritidis by Salmonella Gallinarum in Poultry*. Emerg Infect Dis. 6, 444-449.
27. **Wray C, Sojka WJ, Pritchard DG, Morris JA**, (1983). *Immunization of animals with gal E mutants of "Salmonella typhimurium"*. Dev Biol Stand. 53, 41-6.
28. **Zhang-Barber L, Turner A.K, Barrow P.A.** (1999). *Vaccination for Control Salmonella in poultry*. Vaccine. 17, 2538-2545.
29. **Zhang-Barber L, Turner AK, Martin G, Frankel G, Dougan G, Barrow PA**, (1997). *Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of Salmonella Typhimurium growth and colonization*. J. Bacteriol. 179(22), 7186-7190.

***Staphylococcus aureus* Ekzotoksinleri**

Hamit Kaan MÜŞTAK¹, Ömer M. ESENDAL²

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara, ² Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Ankara

Özet: *Staphylococcus aureus*, konakçılarında kolonize olabilmek ve hastalık oluşturabilmek için çok çeşitli ekzotoksinlere sahiptir. Bu ekzotoksinlerin esas görevi konakçı dokularını, bakterinin gelişmesine uygun hale getirmektir. Bu derlemede, *S. aureus* tarafından salgılanan ekzotoksinlerin ve hemolizinlerin yapılarından ve biyolojik fonksiyonlarından bahsedilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, ekzotoksin, hemolizin, yapı, biyolojik fonksiyon.

Exotoxins of *Staphylococcus aureus*

Summary: *Staphylococcus aureus* has a wide variety of exoproteins that contribute to its ability to colonize and cause disease in its hosts. The main function of these proteins are to convert local tissues into suitable condition for bacterial development. This review addresses the structure and biological functions of the exotoxins and hemolysins secreted by *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, exotoxin, hemolysin, structure, biological function.

Giriş

Staphylococcus aureus'un neredeyse bütün suşları bir grup enzim ve sitokin üretir. Salgılanan bu enzim ve sitokinler arasında dört hemolizin (alfa, beta, gamma, ve delta), nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hiyaluronidaz ve kollagenaz bulunmaktadır. Bu proteinlerin esas görevi konakçı dokularını, bakterinin gelişmesine uygun hale getirmektir. Diğer bazı suşlar da, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1), stafilokokkal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEH ve SEI), eksfoliyatif toksin ve lökositin gibi ek ekzoproteinlere sahiptirler. Bunlardan hemolizinler ve lökositin, eksfoliyatif toksin, TSST-1, stafilokokkal enterotoksinler, *S. aureus*'un toksinleridir. Bu toksinlerden, TSST-1 ve stafilokok enterotoksinleri, pirojenik toksin süperantijenleri (PTSAg'ler) olarak da bilinirler (DINGES ve ark., 2000).

1. Hemolizinler ve Lökositin

S. aureus birçok sitotoksik molekül üretir. Bunlar kendi aralarında dört gruba ayrılan hemolizinler (alfa, beta, delta ve gama) ile Panton-Valentin lökositin (PV-lökositin)'dir (DINGES ve ark., 2000).

Alfa-Hemolizin (Alfa-Toksin)

S. aureus suşlarının çoğu bu toksini üretir. Alfa hemolizin memeli hücrelerine; özellikle tavşan eritrositlerine karşı toksik olup, dermonekrotik ve nörotoksik özellikleri de bulunmaktadır. Alfa toksi-

nin 1 µg'ı tavşanlara intravenöz verildiğinde letal etki göstermektedir (DINGES ve ark., 2000).

Alfa hemolizini kodlayan gen (*hla*), ilk defa 1984 yılında Gray ve Kehoe tarafından *S. aureus*'un kromozomundan klonlanmış ve dizin analizi yapılmıştır. Olgun protein 33000 moleküler ağırlığa sahiptir. Yapısında sistin bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarla bazı suşların *hla* genine sahip olmasına rağmen alfa toksin üretmedikleri anlaşılmıştır.

Alfa toksinin belirleyici özelliği eritrositleri lize etme kabiliyetidir. Özellikle tavşan eritrositleri alfa toksinle hemolize, diğer memeli eritrositlerinden yüz kat, insan eritrositlerinden bin kat daha duyarlı hücrelerdir. Alfa hemolizin monomerleri *S. aureus* tarafından salgılanır. Daha sonra bu monomerler silindirik heptamerler yapmak üzere hedef hücrenin membranıyla birleşir. İşte bu oligomerik form ökaryotik hücreleri lize etme özelliğine sahiptir. Silindirik heptamer formu membranda oluşunca, membranda 1 ya da 2 nm'lik porlar şekillenir. Toksin monomeri hücre membranına iki farklı yolla bağlanır. Bunlardan ilki alfa toksinin düşük konsantrasyonlarında şekillenir. Bu durumda yapısı bilinmeyen özel bir hücre yüzey reseptörü proteini bağlarken; alfa toksinin yüksek konsantrasyonlarında toksin non-spesifik olarak hücre membranına kendi bağlanır. Monomer, lipid tabakasına penetre olma kabiliyetine sahiptir. Monomerlerin lipid tabakasını geçmesi heptamerik porların oluşumuyla so-

nuçlanır. Ancak bu porun oluşumunun nasıl şekillendiğine ait kesin bir bilgi yoktur. Ancak toksinin N-terminal bölgesinin hemolitik porun oluşumunda önemli olduğu ortaya konmuştur. Sonuçta oluşan por, K^+ iyonları ile diğer küçük moleküllerin hızla efluksuna, Na^+ ve Ca^{+2} ile moleküler ağırlığı 1000'den düşük olan moleküllerin influksuna ve sonuçta oluşan ozmotik basınç sonucu eritrositlerin rupturuna neden olur (DINGES ve ark., 2000).

Beta-Hemolizin (Sifingomiyelinaz C)

S.aureus'un beta-hemolizini 1935 yılında bulunmuş olup toksinin hemolitik aktivitesinin $37^{\circ}C$ 'de muamele ve $10^{\circ}C$ 'de inkübasyondan sonra daha çok arttığı anlaşılmış ve buna bağlı olarak toksin "sıcak-soğuk" hemolizin olarak adlandırılmıştır (DINGES ve ark., 2000).

Beta-hemolizin 35000 moleküler ağırlıktadır. Beta-hemolizin geni (*hlyB*) kromozomal olarak 4-kb *Clal* DNA fragmentinde lokalize halde bulunmaktadır ve 39000 moleküler ağırlığındaki 330 aminoasitlik polipeptidi kodlamaktadır. Toksin ile *Bacillus cereus*'un sifingomiyelinazı arasında 200 rezidürlük bir homoloji saptanmıştır (%55.7 benzerlik).

1963'de beta-hemolizinin fosforilaz *c* aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu aktivite için Mg^{+2} iyonlarının varlığı ve belli oranda sifingomiyelin ile lizo-fosfodilkolin varlığı gerekmektedir. Eritrositlerin toksin duyarlılıklarındaki farkların, eritrositlerdeki sifingomiyelin içeriği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (DINGES ve ark., 2000).

Delta-Hemolizin (Delta-Lizin, Delta-Toksin)

Çeşitli memeli hücrelerinde membran hasarına yol açan delta-toksin, 26 aminoasitten oluşmuştur. Ortalama 3000 moleküler ağırlıkta ve 26 rezidürlük uzunluğa sahiptir.

Delta-hemolizin'in %97'si *S.aureus* suşları tarafından üretilmektedir. Toksinin yüksek oranda sitotoksik etkisi olmasına rağmen, hastalıkların etiolojisindeki önemi halen tam olarak bilinmemektedir. Toksinin yüksek konsantrasyonlarıyla yapılan deneysel çalışmalarda, toksinin dermonekrotik ve letal aktivitesinin varlığı da ortaya konmuştur (DINGES ve ark., 2000).

Gamma-Hemolizin ve PV-Lökosidin

Gama-hemolizin neredeyse *S.aureus*'un bütün suşları tarafından üretilmektedir ancak PV-lökosidin, suşların yalnızca %2-3'ü tarafından üretilir. Her iki toksin de iki komponentten oluşmuştur. Bu komponentler S ve F komponentleri olarak bilinir ve birbirleriyle ilişkisi olmayan salgısal protein olarak üretilir (DINGES ve ark., 2000). Prevost ve ark., (1995), bu komponentlerin, *S.aureus*'un genomundaki iki farklı bölgeden meydana geldiğini ve bunun sonucunda da toksinlerin oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Her iki sitotoksini de içeren *S.aureus* suşlarında, üç S komponenti (HlgA, HlgC ve LukS-PV), iki F komponenti (HlgB ve LukF-PV) bulunmaktadır.

Gama-hemolizin genleri, 4,5 kb *Scal* kromozomal bölgesindeki, tek bir lokustan transkripte edilmektedirler. Bu genlerin açık ifadeleri sırasıyla *hlgA*, *hlgC* ve *hlgB*'dir. Bu üç genin kodladığı proteinler birleşerek olgun, salgısal toksini oluştururlar. HlgA gama-hemolizinin γ_1 komponenti olarak, HlgC ise γ_2 komponenti olarak tanımlanmıştır. HlgB ve HlgC beraber gama-hemolizini oluştururlar. *hlg* lokusu, lökosidin R'yi kodlayan *lukR* lokusu ile hemen hemen benzer yapıya sahiptir. Aralarında sadece birkaç nükleotid farklılığı mevcuttur (DINGES ve ark., 2000).

Prevost ve ark., (1995); PV-lökosidin'i kodlayan genleri de klonlamış ve dizin analizlerini yaparak genleri (*lukS-PV* ve *lukF-PV*) tanımlamışlardır. *S.aureus*'un kromozomundaki 6,5 kb'lık *EcoRV* fragmenti *luk-PV* lokusunu tam olarak içermektedir. Klondan ekstrakte edilen protein lökotoksik özellik gösterirken, hemolitik aktivite göstermemektedir. *lukS-PV* geni, 28 rezidürlük sinyal sekansını içeren, 312-aminoasitlik polipeptidi kodlamaktadır. Genin kodladığı LukS-PV olgun proteini, 32000 moleküler ağırlığa sahiptir. *lukF-PV* geni ise benzer şekilde, 24 rezidürlük sinyal peptidini içeren, 325-aminoasitlik, 34000 moleküler ağırlığındaki olgun LukF-PV polipeptidini kodlamaktadır.

Yukarıda sözü edilen üç S komponenti ve iki F komponenti aralarında birleşerek altı farklı, gama-hemolizin/PV-lökosidin toksinlerini oluştururlar (DINGES ve ark., 2000). König ve ark., (1997), bu alt ünitelerin tek başlarına hemolitik ve lökotoksik aktiviteye sahip olmadıklarını ortaya koymuşlardır. Oysaki çiftler halinde eritrositlere eklendiklerinde farklı seviyelerde aktivasyonlara sahip oldukları

saptanmıştır. Bunlardan; HlgA-LukF-PV ve HlgC-HlgB yüksek hemolitik aktiviteye sahipken, HlgA-HlgB çifti içlerinde en yüksek hemolitik aktiviteye sahip olanıdır. Diğer kombinasyonlarda daha düşük hemolitik aktivite gözlenmiştir. Bununla birlikte bütün altı olası kombinasyon da lökositleri lize etme yeteneğine sahiptir.

Bu iki komponentli toksinlerin yangısal olaylardaki rolleri de incelenmiştir. PV-lökosidin'in, polimorf nükleer lokositlerde granül sekresyonunu ve yangısal medyatörlerin salınmasını uyardığı ortaya konmuş ancak gama-hemolizinin aynı yeteneğe sahip olup olmadığı açıklığa kavuşturulamamıştır. Siqueira ve ark., (1997), toksin komponentlerindeki bütün kombinasyonları incelemişler ve gama-hemolizinin polimorf nükleer lökositleri, PV-lökosidin'e göre daha az uyardığını ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda S alt ünitesinin, F alt ünitesine göre immun yanıtın şekillenmesinde daha önemli olduğu anlaşılmıştır.

2. Eksfoliatif Toksin

Önceleri, esas olarak faj litik grup II *S.aureus*'ların eksfoliatif toksin üretiminden sorumlu oldukları düşünülmekteydi ancak günümüzde bütün faj gruplarının eksfoliatif toksin üretebileceği anlaşılmıştır (LADHANI, 2001).

Eksfoliatif toksinler, geniş eksfoliasyonlardan ufak su kabarcıklarına kadar çok geniş bir yelpazede hastalık oluşturabilmektedirler. Bunlardan dermatitis eksfoliativa, pemfigus neonatorum, Lyell hastalığı ve Ritter hastalığı en iyi bilinenlerdir. Eksfoliatif toksinin yapmış olduğu en yaygın hastalık, Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) (Stafilokokkal Haşlanmış Deri Sendromu) adı ile anılan hastalık tablosudur. SSSS çocuklarda nadiren, büyüklerde ise ciddi hastalık tablolarıyla beraber seyrettiğinde %50 oranında mortaliteye neden olabilir. Ancak toksinin yapısı ve etkilerinin araştırılmasıyla hastalığa karşı yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (LADHANI, 2003).

1970 yılında Melish ve Glasgow, *S.aureus*'un salgıladığı bir ekzoproteinini yenidoğan farelerde eksfoliasyondan sorumlu olduğunu ortaya koyana kadar, SSSS ile *S.aureus* arasındaki ilişki açıklığa kavuşmamıştır. Bu toksin daha sonra izole edilmiş, sekans analizi yapılmış, karakterize edilmiş ve başka bir bakteride (*E. coli*) klonlanmıştır (LADHANI, 2001).

S.aureus antijenik olarak birbirinden farklı dört adet toksin serotipi üretmektedir. Bunlardan eksfoliatif toksin A (ETA) ve B (ETB) insanlarda görülen SSSS vakalarından sorumlu toksin serotipleridir. Epidemiyolojik çalışmalar, ETA'nın Avrupa ve Amerika'da baskın serotip olduğu, ETB'nin ise Japonya'da daha yaygın görüldüğünü ortaya koymuştur (LADHANI ve ark., 1999). ETA, 242 aminoasitlik, 26950 Da moleküler kütleye sahip, ısıya dirençli bir toksin olup ETA geni kromozomlarda lokalize halde bulunmaktadır. ETB ise 246 aminoasitlik, 27274 Da moleküler kütleye sahip, ısıya duyarlı bir toksindir ve geni plazmid lokalizasyonuna sahiptir. *S.aureus*, bunların yanında eksfoliatif toksin C (ETC) ve D (ETD) toksin tiplerini de sentezlemektedir. ETC, 27-kDa'luk, ısıya duyarlı bir toksin olup, bir attı bulunan deri infeksiyonundan izole edilmiştir. Bunun yanında ETC'nin, yeni doğan farelerde ve civcivlerde intraepidermal çatlaklar oluşturduğu gözlenmiştir. ETD ise ilk defa, klinik *S.aureus* izolatlarına ait genomların, *eta* ve *etb* genleri için problemlerle görüntülenmesi sırasında bulunmuştur. ETD, 27-kDa'luk bir protein olup, ETA ile %40, ETB ile %59 ve ETC ile %13 oranında bir benzerlik taşımaktadır. Ancak araştırmacılar, ETD ile SSSS arasında kuvvetli bir ilişkinin olmadığını, ETD'nin daha çok derinin epiteliyal bariyerinin bozulması ve bakterinin lokal dokulara bu sayede invaze olarak, rahatça üreyebilmesine olanak sağlaması konusunda yardım ettiğini öne sürmektedirler. ETA ve ETB toksinleri yapılarında benzer olarak 2 bölgeye sahiptir (S1 ve S2). Her bölge 6 iplikli β yumağına ve C-terminal α -heliksine sahiptir. Toksinlerin S1 bölgesinin N-terminal kısmının ortasında ise treonin ve histidin aminoasitleri bulunmaktadır (LADHANI, 2001).

Domuz yavrularında yapılan araştırmalar sonunda *Staphylococcus hyicus*'un, *S.aureus*'un eksfoliatif toksinine benzer bir grup toksin ürettiği anlaşılmış ve bu toksinlerin deri erozyonları, eksfoliasyon ve su kabarcığı formasyonu ile karakterize eksudatif epidermitis oluşturduğu ortaya konmuştur (LADHANI, 2001).

Amagai ve ark., (2000), eksfoliatif toksinin epidermal hedefi üzerine çalışmalar yaparken; SSSS ile pemphigus foliaceus'un klinik ve histolojik olarak benzer deri lezyonlarına sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. Pemphigus foliaceus, desmoglein-1'in otoantikolar tarafından ortadan kaldırılmasıyla

şekillenen bir otoimmün deri bozukluğudur. Desmoglein-1 ise chaderin gen süperailisine dahil, bir transmembran desmosomal glikoprotein olup, süperfisiyal epidermisteki keratinositlerin birbirleriyle olan adezyonlarını korumaktadır (LADHANI, 2001).

3. PTSAg Ekzotoksin Ailesi

PTSAg'ler, *S.aureus* ve *Streptococcus pyogenes* tarafından salgılanan ekzotoksin grubudur. PTSAg ailesi TSST-1 ile birçok stafilokokkal enterotoksini (SEA, SEB, SEC, SED, SEE ve SEH) ve birçok streptokokkal pirojenik ekzotoksini (SPE A, B, C, F, G, H ve J ile streptokokkal süperantijen) içermektedir. Bu ekzotoksinlerin her biri en az üç biyolojik özellik göstermektedir: pirojenite, süperantijenite ve endotoksin letalitesinin kuvvetlendirilmesi. Bazı PTSAg'ler ek özellikler de gösterebilmektedir. Örneğin; stafilokokkal enterotoksinler (SE'ler) kuvvetli emetik ajanlardır ancak diğer PTSAg'lerin böyle bir özelliği bulunmamaktadır. Bunun yanında TSST-1 mukozal yüzeyleri geçme kabiliyetine sahiptir ve bakteriyel hücre duvarı-uyarımlı arthritisi reaktif eden tek ajandır. PTSAg'lerin en önemli özelliği süperantijenitedir. PTSAg'ler T lenfositlerinin proliferasyonunu stimüle ederler (DINGES ve ark., 2000).

Fonksiyonel benzerliklerinin yanında stafilokokkal PTSAg'ler birçok ortak genetik ve biyokimyasal özellik de taşımaktadırlar. Toksinleri kodlayan genler plazmidler, bakteriyofajlar ve heterolog genetik elementler tarafından taşınırlar ve bunlar patojenite adalarıyla ilgilidir. Bunların ekspresyonu üç düzenleyici sistem tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar; aksesör gen düzenleyici (*agr*), stafilokokkal gen düzenleyici (*sar*), ve bir katabolit baskılayıcı sistemdir (DINGES ve ark., 2000). Her toksin amino-terminal sinyal sekansı içeren bir prekürsör protein içine transle olur. Olgun PTSAg'ler, moleküler ağırlıkları 20000 ile 30000 arasında olan küçük, nonglikoasile, polipeptid molekülleridir. PTSAg'ler kimyasal inaktivasyona, proteolizise ve ısıyla denaturasyona karşı kısmen dayanıklıdır. PTSAg'lerin kendi aralarında aminoasit sekanslarının karşılaştırılması sonucu, %22 ile %80 arasında benzerlik saptanmıştır (SCHLIEVERT ve ark., 1995).

Toksik Şok Sendrom Toksin 1

TSST-1; bakteriyel kromozomun, stafilokokkal patojenite adası 1 olarak bilinen 15.2 kb'lık mobil genetik elementinde bulunan, *tstH* (H insan izolatu olduğunu ifade eder) tarafından kodlanır. TSST-1, 234 aminoasitlik prekürsör protein şeklinde transle olur ve amino-terminal kısmında bulunan 40 aminoasitlik sinyal dizini ayrıldıktan sonra salgılanır. Olgun protein, moleküler ağırlığı 22000, izoelektrik noktası (pI) 7.2 olan tek polipeptid zincirinden oluşmaktadır. TSST-1 yüksek oranda hidrofobik aminoasit içermesine rağmen sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir. Toksin genelde ısı ve proteolizise karşı dirençlidir. Aynı zamanda tripsinle uzun süre muamele edildiğinde yine yapısında bir bozulma şekillenmez (DINGES ve ark., 2000).

TSST-1 birbirine yakın iki bölgeden oluşmaktadır. A bölgesi merkezde, 5 iplikli β -yumağıyla çevrilmiş, uzun bir α -heliks'e sahiptir. B bölgesi ise pençe şeklinde 5 adet β -ipliğinden oluşmaktadır (DINGES ve ark., 2000). TSST-1 mutantlarıyla yapılan çalışmalar, bu sentral α -heliks'in arka tarafındaki rezidülerin, TSST-1'in süperantijenik aktivitesi için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (BONVENTRE ve ark., 1995).

TSST-1'in süperantijenitesindeki düşüş, T hücre reseptörü (TCR)'ne, MHC sınıf II moleküllerine veya her ikisine birden bağlanmadaki azalma sonucu şekillenir. Yapılan çalışmalarla, TSST-1 üzerindeki TCR ve MHC sınıf II moleküllerinin bağlanma bölgeleri tespit edilmiş ve TSST-1'in süperantijenik aktivitesi için kesinlikle, MHC sınıf II molekülüne bağlanmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır. MHC sınıf II-peptid kompleksi üzerindeki TCR bağlanma bölgeleri TSST-1 tarafından kısmen ya da tamamen kapatılır. Bu sayede daha sonradan MHC sınıf II molekülü ve TCR arasında oluşabilecek etkileşimler engellenmiş olur (DINGES ve ark., 2000).

Stafilokokkal Enterotoksinler

Stafilokokkal enterotoksin (SE)'ler, 5 temel serolojik tipten oluşan (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), ısıya dayanıklı enterotoksinlerin oluşturduğu bir gruptur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda SE'lerin yeni tiplerinin de var olduğu (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO) bildirilmiştir (DINGES ve ark., 2000).

SE'ler tek zincirli basit proteinlerden oluşan toksinlerdir. 26-35 kDA (kilodalton) molekül ağırlığına sahiptirler. Yapılarında yüksek oranda lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin bulunmaktadır. Bunların yanında iki adet yarım sistin rezidüsü ve bir ya da iki adet triptofan bulunur (DINGES ve ark., 2000).

SE'ler higroskopik özellik göstererek su ve tuzlu solüsyonlarda çözünbilme özelliğine sahiptirler. Enterotoksinler, pH < 2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidirler. Ancak bazı bakteriler (laktik asit bakterileri) tarafından üretilen proteazlar SE'leri parçalayabilirler (DINGES ve ark., 2000). Bunların yanında SE'lerin en önemli özelliği ısıya dayanıklı olmalarıdır. SE'lerin ısıya dayanıklılıkları üzerine yapılan bir çalışmada, 100°C'de SEA ve SEB'nin 90 dakikada, SEC'nin 180 dakikada, 120°C'de ise SEA ve SEB'nin 30 dakika, SEC'nin de 60 dakikada tamamen inaktive olduğu ortaya konmuştur (TIBANA ve ark., 1987). Toksinler kurumaya ve gama ışınlarına da yüksek direnç gösterirler (DINGES ve ark., 2000).

SE'ler kuvvetli gastrointestinal toksin olmalarının yanında kuvvetli süperantijenik özellikleri ile de non-spesifik olarak T-hücre proliferasyonunu stimüle ederler (HARIS ve ark., 1993).

Stafilokokkal Enterotoksin A (SEA): SEA, stafilokokkal gıda zehirlenmelerine sebep olan en önemli toksindir. SEA geni (*entA*) 771 baz çiftinden oluşmuştur ve bir bakteriyofaj tarafından taşınır. SEA'nın üç farklı izoelektrik noktasına sahip üç formu mevcuttur (BALABAN, 2000; DINGES ve ark., 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB): SEB'yi kodlayan gen (*entB*), yaklaşık 900 nükleotid içerir. SEB prekürsör proteini 267 aminoasitten oluşur ve 27 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidini içerir. *S.aureus*'un gıda zehirlenmelerinden sorumlu olan klinik izolatlarında *entB* geni kromozomal yapıdayken, diğer bakteri suşlarında genin 750 kb'lık bir plazmid tarafından taşındığı bildirilmiştir (BALABAN, 2000; DINGES ve ark., 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin C (SEC): Antijenik olarak SEC'nin SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç farklı alt tipi bulunmaktadır. *entC3* geni 801 baz çiftlik (bp'lik) olup, 27 rezidülük sinyal peptidini içeren 267 aminoasitlik prekürsör pro-

teini kodlar. *entc2* geni 801 bp'lik olup 267 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. SEC'yi kodlayan 801 bp'lik *entC1* geni ise 266 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. *entC3* ile *entC1* arasında %98'lik nükleotid sekans benzerliği bulunmuştur (BALABAN, 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin D (SED): SED'nin gıda zehirlenmelerinde karşılaşılan diğer bir önemli toksin olduğu bildirilmiştir. SED'yi kodlayan gen (*entD*) pIB485 olarak bilinen 27,6 kilobaz'lık penisilinaz plazmidini üzerinde taşınmaktadır. Bu gen 30 aminoasitlik sinyal peptidi çeren 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. 228 aminoasitlik olgun polipeptit diğer SE'lerle sekans benzerliği göstermektedir (BALABAN, 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin E (SEE): SEE geni (*entE*) 771 bp'lik olup 26 kDa'lık prekürsör proteini kodlar. Sekans analizleri SEE, SED ve SEA'nın birbiriyle yakın ilişkili olduğunu göstermiştir (VAN DEN BUSSCHE, 1993; BALABAN, 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin G (SEG): SEG geni (*entG*) 777 nükleotid içerir ve 233 aminoasitlik toksine dönüşmesi için 258 aminoasitlik prekürsör proteinini kodlar (BALABAN, 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin H (SEH): SEH, 27300 Da moleküler ağırlığa sahip, yeni bulunmuş bir enterotoksindir (BALABAN, 2000).

Stafilokokkal Enterotoksin I (SEI): SEI geni (*entI*) 729 nükleotit içerir ve 242 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. Olgun toksin yapısında 218 aminoasit barındırır. SEI diğer SE'lerle en az benzerliğe sahip toksindir (BALABAN, 2000).

Kaynaklar

1. Amagi M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR, (2000). *Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets demogelin-1*. Nat Med. 6, 1275-1277.
2. Balaban N, Rasooly A, (2000). *Staphylococcal enterotoxins*. Int J Food Microbiol. 61, 1-10.
3. Bonventre PF, Heeg H, Edwards III CD, Cullen CM, (1995). *A mutation at histidine residue 135 of toxic shock syndrome toxin yields an immunogenic protein with minimal toxicity*. Infect Immun. 63, 509-515.
4. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM, (2000). *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 13 (1), 16-34.

5. **Gray GS, Kehoe M**, (1984). *Primary sequence of the α -toxin gene from Staphylococcus aureus* Wood 46. *Infect Immun.* 46, 615-618.
6. **Harris TD, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR, Betley MJ**, (1993). *Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins.* *Infect Immun.* 61, 3175-3183.
7. **Konig B, Prevost G, Konig W**, (1997). *Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions.* *J Med Microbiol.* 46, 479-485.
8. **Ladhani S, Joannou CL, Lochric DP, Evans RW, Poston SM**, (1999). *Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded skin syndrome.* *Clin Microbiol Rev.* 12, 224-242.
9. **Ladhani S**, (2001). *Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome.* *Clin Microbiol Infect.* 7, 301-307.
10. **Ladhani S**, (2003). *Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus.* *FEMS Immunol Med Microbiol.* 39 (2), 181-189.
11. **Melish ME, Glasgow LA**, (1970). *The staphylococcal scalded skin syndrome: development of an experimental model.* *New Engl J Med.* 282, 1114-1119.
12. **Prevost G, Cribier B, Couppie P, et al.** (1995). *Panton-Valentine leukocidin and gamma hemolysin from Staphylococcus aureus ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities.* *Infect Immun.* 63, 4121-4129.
13. **Schlievert PM, Bohach GA, Ohlendorf DH, et al.** (1995). *Molecular structure of staphylococcus and streptococcus superantigens.* *J Clin Immunol.* 15, 4S-10S.
14. **Siqueira JA, Speeg-Schatz C, Frehas FIS, Sahel J, Monteil H, Prevost G**, (1997). *Channel-forming leucotoxins from Staphylococcus aureus cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model.* *J Med Microbiol.* 46, 486-494.
15. **Tibana A, Rayman K, Akhtar M, Szabo R**, (1987). *Thermal stability of enterotoxins A, B, and C in a buffered system.* *J Food Prot.* 50, 239-242.
16. **Van den Bussche RA, Lyon JD, Bohach GA**, (1993). *Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family.* *Mol Phylogenet Evol.* 2 (4), 281-292.

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 JL, (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. Mikrobiyol. 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 yöntemle 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:.....