

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 20 ♦ Sayı/Number 1-2 ♦ 2009

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 20 ♦ Sayı/Number 1-2 ♦ 2009
The Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year
ISSN 1016-3573

Enstitü Adına Sahibi

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

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editor-in Chief*
Dr. Nahit Yazıcıoğlu

Editör Yardımcıları / Co-Editors *

Dr. Erhan Akçay
Dr. Rauf Akkaya
Uzm. Yıldız Ayaz
Dr. Asiye Dakman
Dr. Arife Ertürk
Dr. Uğur Küçükayan
Dr. H. Kaan Müştak
Dr. Yavuz Ulusoy
Dr. Armağan Erdem Ütük

Danışma Kurulu / Advisory Board *

Prof.Dr. Mehmet Akan
Prof.Dr. Sevil Atalay Vural
Yrd.Doç.Dr. Osman İrfan İlhak
Prof.Dr. Müjgan İzgür
Doç.Dr. Oğuz Kul
Prof.Dr. Ergün Köroğlu
Prof.Dr. Mustafa Ortatlı
Prof.Dr. Aykut Özkul
Doç.Dr. Barış Sareyyüpoğlu
Doç.Dr. Sami Şimşek
Prof.Dr. Hakan Yardımcı
Prof.Dr. Ender Yarsan

Adres / Address

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

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

Tasarım ve Baskı



MEDİSAN

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

İçindekiler / Contents

Araştırma Makaleleri / Research Articles

Sayfa /Page

Türkiye’de çiğ sütlerde bazı organik fosforlu insektisit kalıntılarının incelenmesi

Investigation of some organophosphorus insecticide residues in raw milk in Turkey

F. İpek Keskin, Sezai Kaya 1

Aspergillus parasiticus NRRL 2999 suşu ile küflendirilmiş yemlerle beslenen kaz palazlarında (*Anser Anser domesticus*) görülen patolojik bulgular

The pathological findings in young goose (*Anser Anser domesticus*) fed with moulded with *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999

Mehmet Tuzcu, Abdullah Doğan, Nevin Tuzcu, Doğan Akça 11

Investigation of *Taylorella equigenitalis* from thoroughbred stallion genital swabs by direct polymerase chain reaction and culture method

Safkan yarış aygırlarından alınan genital svaplarda direkt polimeraz zincir reaksiyonu ve kültür yöntemi ile *Taylorella equigenitalis*'in araştırılması

H. Kaan Müştak, Elçin Günaydin, Asiye Dakman, Uğur Küçükayan 19

Prevalence of *Neospora caninum* in cows with stillbirth and abortion

Ölü doğum ve abort yapan ineklerde *Neospora caninum* prevalansı

F. Çiğdem Pişkin, Armağan Erdem Ütük 23

Damızlık tavuk işletmelerinde tespit edilen mikoplazma infeksiyonları

Mycoplasma infections detected in breeder holdings

Asiye Dakman, Elçin Günaydin, Mehmet Ali Türkyılmaz, Metin Güleç, Mustafa Coşar, Ümit Özdemir 27

Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

Atık fetus mide içeriklerinden konvansiyonel kültürel yöntem ve polimeraz zincir reaksiyonu ile *Brucella* spp.’nin teşhisi

Diagnosis of *Brucella* spp. by conventional cultural method and polymerase chain reaction in stomach contents of aborted fetuses

H. Kaan Müştak, Elçin Günaydin, Uğur Küçükayan, Asiye Dakman 35

Olgu Sunumu / Case Report

Kınalı keklıklar (Alectoris chukar) Eimeria tenella ve Eimeria kofoidi’nin neden olduğu koksidiyozis olgusu

Coccidiosis in chukar partridges (*Alectoris chukar*) caused by *Eimeria tenella* and *Eimeria kofoidi*

Armağan Erdem Ütük, F. Çiğdem Pişkin 39

Derleme / Review

Batı Nil Virus enfeksiyonu

West Nile Virus infection

Arife Ertürk, M. Fatih Barut, Şirin G. Çizmeci 43

Kontagiyöz equine metritis

Contagious equine metritis

H. Kaan Müştak 51

Türkiye’de çiğ sütlerde bazı organik fosforlu insektisit kalıntılarının incelenmesi*

F. İpek KESKİN¹, Sezai KAYA²

¹Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Doping Kontrol Laboratuvarı, Ankara; ²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Özet: Bu çalışma Türkiye’de üretilen çiğ sütlerde bazı organik fosforlu (OF) insektisit kalıntılarının belirlenmesi için yöntem uyarlaması yapılması, bu yöntemle kalıntıların belirlenmesi, sonuçların gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yürütülen Ulusal Kalıntı İzleme Planı kapsamında 2005 yılında 15, 2006 yılında 54, 2007 yılında ise 55 çiğ süt numunesi Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde diazinon, diklorvos, dimetoat, klorprifos, koumafos, malatyon ve metidatyon’u içeren 7 OF insektisit yönünden Di Muccio ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadan uyarlanarak analiz edilmiştir. Yöntemin duyarlılığı, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği belirlendikten sonra, Türkiye’de 41 ilden gelen 124 süt örneğinde 7 farklı OF insektisit kalıntısı elektron yakalayıcı detektör (ECD) ve alev fotometrik detektör (FPD) ile donatılmış gaz kromatografi cihazı ile incelenmiştir. Çalışmada OF insektisit standartları gaz kromatografi cihazına tanıtılmış, çıkış süreleri belirlenmiş, her bir standardın kalibrasyon eğrisi çizilmiş, tanımlama ve hesaplama alt sınırları tespit edilmiş ve standartlar insektisit içermeyen süt örneklerine katılarak geri alım yüzdeleri belirlenmiştir. ECD’de insektisit standartlarının tanımlama alt sınırları çok yüksek olduğundan sütlerin analizinde FPD kullanılmıştır. Çalışmada analizi yapılan hiçbir süt örneğinde OF insektisit kalıntısına rastlanmamıştır.

Anahtar sözcükler: Çiğ süt, gaz kromatografi, kalıntı, organik fosforlu insektisit

Investigation of some organophosphorus insecticide residues in raw milk in Turkey

Summary: This study was carried out to investigate some of organophosphorous (OF) insecticide residues for adapted the method, determined the residues and to evaluate the results according with food safety and public health in milk produced in Turkey. In the study within the National Residue Monitoring Plan carried out by Ministry of Agriculture and Rural Affairs General Directorate of Protection and Control in 2005 15, in 2006 54 and in 2007 55 raw milk samples were evaluated according 7 different OF insecticides including diazinon, dichlorvos, dimethoate, chlorpyrifos, coumaphos, malathion and methidathion in Etlik Central Veterinary Control and Research Institute by adapting the study made by Di Muccio and his colleagues. After determination of the sensitivity, stability and repeatability of the method, the residue of 7 different OF insecticide residues in 124 milk samples came from 41 cities in Turkey was investigated by means of gas chromatography equipped with electron capture detector (ECD) and flame photometric detector (FPD). In the study the insecticide standards was introduced to gas chromatography, the retention time was obtained, curve of calibration of every standard was drawn, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was detected and recovery percentages was detected by adding standards to the milk samples that do not contain insecticide. FPD was used in analyzing milk because of LOD of insecticide standards were very high in ECD. In the study the residue of OF insecticides were not detected in none of the analyzed milk samples.

Keywords: Gas chromatography, organophosphorus insecticide, raw milk, residue

Giriş

Pest (haşere) adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan maddelere pestisit denir. Genel bir ifade ile, insan, hayvan, bitki ve cansız cisimlerin üzerinde ya da çevresinde bulunan veya yaşayan ve besin maddelerinin üretimi, işlenmesi, hazır-

lanması, depolanması, tüketimi ve taşınması sırasında onların besin değerini azaltan veya hasara uğratan böcek, kemirici, yabancı ot, mantar, toprak kurdu gibi hastalık ve zararlı etmenlerini öldürmek, gelişmelerini veya üremelerini engellemek için kullanılan biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Evcil hayvanların vücut yüzeyinde veya bit-

* 25.07.2008 tarihinde kabul edilen aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

kiler ve cansız cisimler üzerinde yaşayan parazit insektleri (eklem bacaklı hayvanları) öldürmek amacıyla kullanılan ilaçlara ise insektisit denir (KUTER, 1994; ŞANLI, 1999; KAYA, 2002; KAYA, 2007).

Gıdalarda kirlenmeye yol açan çok çeşitli yabıda ve sayıda madde vardır. Bunlardan bazıları bitkilerin ve dolayısıyla gıda maddelerinin yapısında doğal olarak vardır; bazıları biyolojik veya kimyasal kirlenmeye yol açarlar; bazıları da gıda maddelerinin korunması ve benzeri amaçlarla isteyerek katılırlar. Pestisitler gıdalarda kimyasal kirlenmeye yol açarlar (KAYA, 2002).

Bir veya birden fazla süt hayvanından elde edilen, içerisine herhangi bir madde ilave edilmemiş veya içerisinden herhangi bir madde alınmamış, sıvı halde tüketime hazır olan ya da ileri gıda üretim işlemine sunulacak olan normal meme bezi salgısına süt denir. 40°C'nin üzerine ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi bir işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısına ise çiğ süt denir (ANON, 2000b; ANON, 2002).

Tarım zararlıları ve hastalık taşıyıcı haşerelerle savaş amacıyla doğrudan çevreye uygulanan ve hayvan dış parazitlerinin yok edilmesi için kullanılan insektisit artıklarıyla sağılan hayvanların bulaşma riski oldukça yüksektir. Süte geçebilen bu maddeler süt ve süt ürünlerinin halk sağlığı yönünden tehlikeli olmasına yol açarlar (ŞANLI, 1999; KAYA, 2002).

OF pestisitlerin direnç ve kalıcılıklarının az olmasına rağmen süte birçok yolla geçerler. Bunlar hasat sonrası uygulama ya da kirlenme ile fazla miktarda OF pestisit kalıntısı içeren hububat, kuru ot, saman ve diğer ürünlerin hayvan yemi olarak kullanılması, büyüme sezonu boyunca pestisitlerle muamele edilen bitkiler ile hazırlanan yem maddelerinin hayvan beslenmesinde kullanılması, hayvanlarda iç ve dış parazitlerinin kontrolü amacı ile insektisitlerin direkt olarak hayvanlar üzerine sprey ya da daldırma şeklinde uygulanması, süt işleme fabrikalarında hamamböcekleri ve diğer böceklerle karşı mücadele uygulamaları, sineklere karşı hayvan barınaklarında ilaçlama amacı ile insektisitlerin kullanılması, hem tarımsal alanlarda hem de tarımsal alanların dışında kullanılan pestisitlerin hayvanların içme sularına karışması, çevresel kirlilik, bulaşık meralar, ilaçlanmış alan-

lardaki havayı hayvanların solumasıdır (LINO ve SILVERIA, 1992; KUTER, 1994; TOEWS ve MCEWEN, 1994; MUCCIO ve ark., 1996; SALAS ve ark., 2003; RODRIGUEZ ve ark., 2005; ZHANG ve ark., 2005; PAGLIUCA ve ark., 2006).

Avrupa Birliği Komisyonunca yayınlanan 96/23/EC sayılı direktifi esas alınarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 19.01.2005 tarih ve 25705 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemler Yönetmeliğinde" OF bileşikler gıdalarda kalıntısı aranacak maddeler içinde (Ek II) B3b'de yer almaktadır. Bu yönetmelik çerçevesinde çiğ süt numuneleri süt çiftliklerindeki toplama tanklarından ve süt tesislerinde tankerler boşaltılmadan önce alınmaktadır. Numuneler en az 300 adet olmak üzere yıllık süt üretiminin her bir 15.000 tonu için bir numune alınması ile belirlenmektedir. Numunelerin %15'i B3'de yer alan kalıntılar için test edilmektedir (ANON, 1996; ANON, 2000a; ANON, 2005a).

Çalışmanın temel amacı Ulusal Kalıntı İzleme Planı kapsamında sütlerde OF insektisit kalıntılarının ölçülmesinde kullanılacak bir yöntem uyarlanması yapmak, bunu laboratuvar analizleri için güncel kullanıma sokmak; bu yöntemle de çeşitli illerden üretim kapasitesine göre gönderilen sütlerde bazı OF bileşiklerin kalıntı analizlerini yapmaktır. Bu çalışmada Ülkesel Kalıntı İzleme Planı çerçevesinde analizi yapılacak çiğ sütlerde OF insektisit kalıntılarının belirlenmesi için duyarlı, güvenilir, tekrarlanabilir bir yöntem uyarlanması yapıldı; bu yöntemle de sütlerde diazinon, diklorvos, dimetoat, klorprifos, koumafos, malatyon ve metidatyon kalıntıları belirlendi. Sonuçlar, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ve ilgili diğer mevzuat kapsamında sütlerde bulunmasına izin verilen OF insektisit kalıntıları ile halk sağlığı ve gıda güvenliği yönünden değerlendirildi.

Materyal ve Metot

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Toksikoloji Laboratuvarına Ekim 2005-Aralık 2007 yılları arasında 41 farklı ilden gelen 124 çiğ süt numunesi analiz edilmiştir. Süt numuneleri analiz edilinceye kadar 4°C'de tutulmuştur. Numuneler aynı gün ve-

ya ertesi gün analiz edilmiştir. Süt numunelerinin gelmiş olduğu iller ve sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Sütlerin analizinde, insektisitlerin sütlerden özütlenmesinde ve gaz kromatografi cihazına uygulanmasında daha önceden ön çalışmalarla kullanılması seçilen Muccio ve ark. (1996) tarafından bildirilen kalıntı analiz yönteminden yararlanılmıştır. Gaz kromatografi cihazında insektisitlerin belirlenmesinde iki detektör çeşidi (ECD, FPD) kullanılmış; duyarlılık yönünden aralarında fark olup olmadığı ortaya konulmuştur.

İnsektisit standart solüsyonlarının hazırlanıp gaz kromatografi cihazına tanıtılması: Kullanılan insektisit standart solüsyonlarının ana stoklarının her birinin yoğunluğu 10 ng/µl'dir. OF insektisitlerden diazinon, diklorvos, dimetoat,

klorprifos, koumafos, malatyon ve metidatyon sikloheksan ile karıştırılarak 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml yoğunlukta insektisit standart solüsyonları hazırlanmıştır.

Elde edilen 20 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml yoğunluğundaki insektisit standart solüsyonları gaz kromatografi ECD ve FPD'ye 3 kez uygulanmış ve kromatogramları alınmıştır. Tanımlama ve hesaplama alt sınırları tespiti için gaz kromatografi cihazında her bir insektisit standardı için Signal to Noise (S/N) değeri hesaplanmıştır.

Diazinon, diklorvos ve malatyon karışım standardı ve dimetoat, klorprifos, koumafos ve metidatyon karışım standardı 1 ng/µl, 0.5 ng/µl, 0.1 ng/µl ve 0.01 ng/µl 4 farklı yoğunlukta hazırlanarak gaz kromatografi cihazına uygulanmış ve kalibrasyon eğrileri çizdirilmiştir.

Tablo 1. Süt numunelerinin gönderildiği iller ve sayıları.

İl	Numune sayısı	İl	Numune sayısı	İl	Numune sayısı
Adana	5	Eskişehir	2	Manisa	2
Afyonkarahisar	1	Edirne	3	Mersin	1
Ankara	5	Elazığ	3	Muğla	1
Antalya	5	Erzincan	1	Osmaniye	4
Ardahan	1	Erzurum	1	Sakarya	3
Aydın	2	İstanbul	4	Samsun	2
Balıkesir	7	İzmir	11	Sivas	2
Bilecik	1	Kahramanmaraş	3	Şanlıurfa	2
Burdur	2	Kars	3	Tekirdağ	2
Bursa	5	Kastamonu	1	Tokat	3
Bolu	1	Kayseri	3	Trabzon	1
Çanakkale	7	Kırklareli	6	Uşak	1
Diyarbakır	5	Kocaeli	1	Van	4
Denizli	1	Konya	6		
Toplam	48		48		28
Genel Toplam					124

Geri alım çalışmaları için pozitif süt numunelerinin hazırlanması: Özütleme işlemi yapılarak gaz kromatografi cihazına uygulanan ve OF insektisit kalıntısı içermediği tespit edilen süt numunelerine özütleme işleminde etanol yerine 20 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml yoğunlukta hazırlanan diazinon, diklorvos ve malatyon karışım standart solüsyonu ve dimetoat, klorprifos, koumafos ve metidatyon karışım standart solüsyonu eklenecek pozitif numuneler hazırlanmıştır.

Hazırlanan pozitif numuneler homojenizasyon aşamasından sonra oda sıcaklığında 3-4 saat bekletilmiş, sonra ECD ve FPD detektörlü gaz kromatografi cihazına uygulanmıştır. Önceden cihaza tanıtılan standartlardan çizilen kalibrasyon eğrileri ile miktar hesabına göre insektisit standartlarının sütten geri alım yüzdeleri aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

İnsektisitlerin sütlerden özütlenmesi: Analizde kullanılacak santrifüj tüpleri, Ultra-Turrax bıçakları, balon jöjeler su ve deterjanla yıkanıp kurutulduktan sonra herhangi bir insektisit kalıntısı bu-

laşması ihtimaline karşılık asetonitrilden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Santifüj tüpüne şarjlı pipetör yardımıyla cam pipetle 5 ml süt alınmıştır. Üzerine şarjlı pipetör yardımıyla cam pipetle 5 ml asetonitril ve 1 ml etanol eklenmiştir. Üç dakika Ultra-Turrax'da 9500 devir/dk homojenize edilmiştir. Bu karışım Exrelut NT-20 kartuştan geçirilmiştir. Petroleterasetonitril-etanol karışımı (100:25:5) hazırlanmıştır. Bu solüsyonun üst fazından 10 ml NT-20 kartuştan geçirilmiştir. NT-20 kartuşun kuruması için 10 dakika beklenmiştir. NT-20 kartuşun altına balon jöje yerleştirilmiştir. Petroleterasetonitril-etanol karışımı üst fazından 9×10 ml NT-20 kartuştan geçirilmiş ve eluat toplanmıştır. Toplanan eluat 40°C düşük basınçta Rotary Evaporatörde uçurularak kurumaya yakına kadar hacmi azaltılmış, sonra oda sıcaklığında kuruyana kadar bekletilmiştir. Kalıntı 1 ml izooktan:aseton (8:2) ile çözülmüştür. Elde edilen solüsyon şişe içi cam tüp bulunan vida kapaklı şişelere alınarak gaz kromatografi cihazına 1 µl uygulanmıştır.

$$\text{Geri Alım (\%)} = \frac{\text{Standart Eklenmiş Pik Alanı} - \text{Kalıntısız Süt Alanı}}{\text{Standart Pik alanı}} \times 100$$

ECD ve FPD detektörlü gaz kromatografi cihaz şartları:

İnlet	Mod: splitless, Giriş sıcaklığı: 240°C
Kolon	Kolon tipi: kapiller kolon, Kolon ölçüleri: 30 m×0.25 mm (uzunluk×çap), Film tabakası kalınlığı: 0.5 µm (ECD), 0.25 µm (FPD), Taşıyıcı gaz tipi: helyum, Taşıyıcı gaz akış tipi: sabit akış, Taşıyıcı gaz akış hacmi: 1.5 ml/dk
Fırın	Giriş sıcaklığı: 60°C, Girişte bekleme süresi: 2 dk Fırın sıcaklık kademeleri: 1. 60°C başlangıç sıcaklığından dk'da 10°C artarak 10 dk'da 160°C'ye ulaşmıştır. 2. 160°C'de beklenilmeksizin dk'da 2°C artarak 45 dk'da 250°C'ye ulaşmıştır. 3. 250°C'de 10 dk beklenmiştir.
Analiz süresi	67 dk
Detektör	ECD: Detektör sıcaklığı: 300°C FPD: Detektör sıcaklığı: başlangıç sıcaklığı: 250°C-FPD sıcaklığı: 150°C, hidrojen akış hacmi: 90 ml/dk, kuru hava akış hacmi: 105 ml/dk, Mod: fosfor modu

Bulgular

Metodun duyarlılığı, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği belirlendikten sonra Türkiye’de 41 ilden gelen 124 çiğ süt örneğinde yapılan analizler sonucunda OF insektisit kalıntısına rastlanmamıştır.

Gaz kromatografi cihazına uygulanan OF bileşiklerin ECD ve FPD’de çıkış süreleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Gaz kromatografi cihazına uygulanan OF bileşiklerin FPD’de tanımlama ve hesaplama alt sınırları Tablo 3’de gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan NT-20 kartuşların emme özelliği ve eluatu elde etmede kullanılan düşük polaritedeki solüsyon, polar, suda çözünen ve karbomil grubu içeren dimetoatın geri alımı için uygun olmadığından geri alım çalışmalarında dimetoat tespit edilememiştir. Ayrıca, diklorvos için geri alım yeterli bulunamamıştır (%40-62.5). İnsektisit içermeyen süt örneklerine katılan OF bileşiklerin FPD’de geri alım yüzdeleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

Şekil 1’de 100 ng/ml yoğunluktaki diazinon, diklorvos ve malatyon karışım standardının FPD kromatogramı, Şekil 2’de 100 ng/ml yoğunluktaki dimetoat, klorprifos, koumafos ve metidatyon karışım standardının FPD kromatogramı gösterilmiştir.

Tablo 2. OF bileşiklerin ECD ve FPD’de çıkış süreleri.

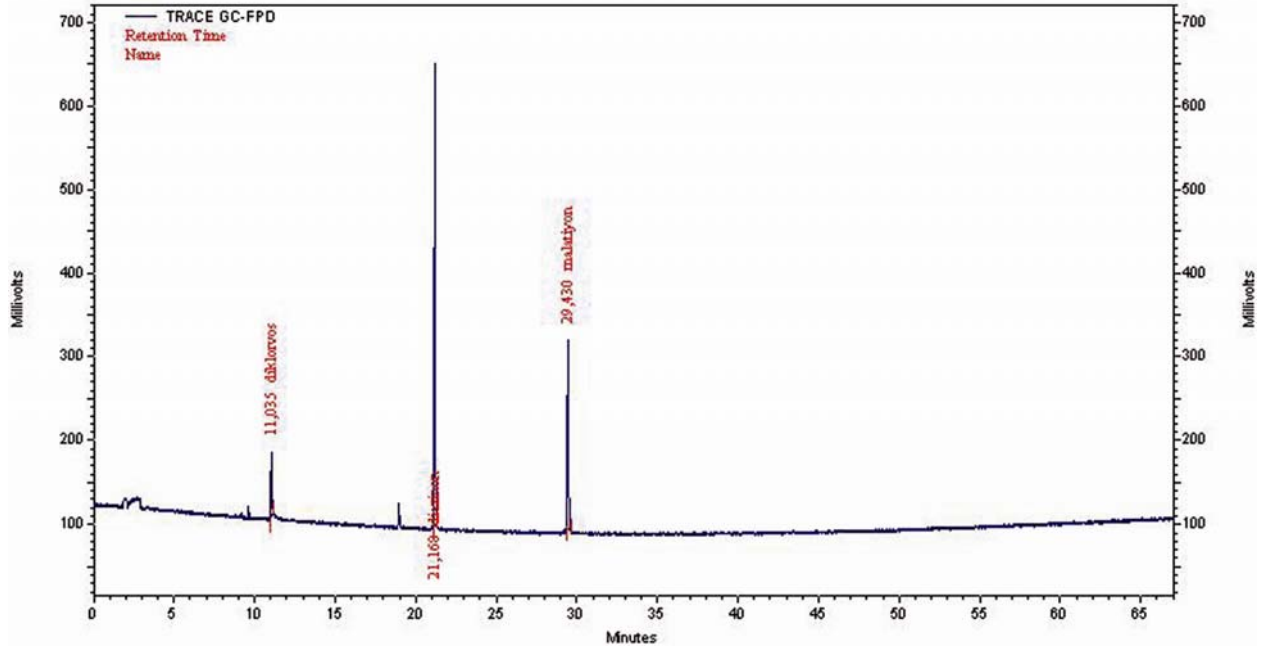
Bileşik	Çıkış süresi (dk)	
	ECD	FPD
Diazinon	27.798-28.150	21.115-21.487
Diklorvos	12.163-12.332	11.035-11.122
Dimetoat	26.792-26.852	24.735-24.783
Klorprifos	36.840-36.895	27.927-28.005
Koumafos	51.147-51.195	61.088-61.238
Malatyon	35.528-35.963	29.388-29.773
Metidatyon	43.052-43.115	35.377-35.443

Tablo 3. OF bileşiklerin FPD’de tanımlama ve hesaplama alt sınırları.

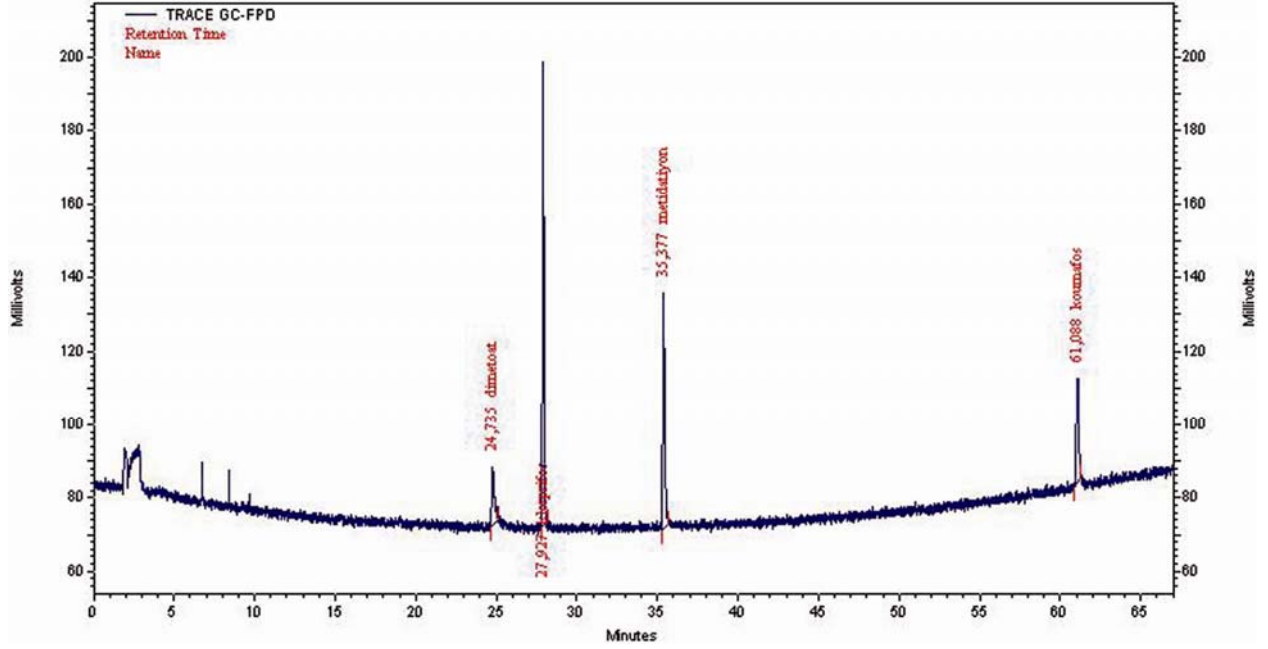
Bileşik	Tanımlama alt sınırı (ng/ml)	Hesaplama alt sınırı (ng/ml)
Diazinon	5	25
Diklorvos	20	50
Dimetoat	20	50
Klorprifos	10	20
Koumafos	20	50
Malatyon	35	100
Metidatyon	10	20

Tablo 4. OF bileşiklerin FPD’de sütlerden geri alımları.

Bileşik	Geri alım (%)			
	100 ng/ml	50 ng/ml	20 ng/ml	Ortalama
Diazinon	82.60	78.50	70	77.03
Diklorvos	40.66	62.50	40	47.72
Dimetoat	-	-	-	-
Klorprifos	79.13	76.70	82.86	79.50
Koumafos	101.56	109	94.16	101.50
Malatyon	79.60	88.50	76	81.30
Metidatyon	102.20	100	106.56	102.90



Şekil 1. 100 ng/ml yoğunluktaki diazinon, diklorvos ve malatıyon karışım standardının FPD kromatogramı.



Şekil 2. 100 ng/ml yoğunluktaki dimetotat, klorprıfos, koumafos ve metıdatıyon karışım standardının FPD kromatogramı.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmanın ilk amaçlarından birisi duyarlı, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem uyarlaması yapmaktır. Süt numunelerine OF insektisitlerden (diazinon, diklorvos, dimetoat, klorprifos, koumafos, malatyon, metidatyon) 20 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml miktarlarında katılmasıyla yapılan geri alım denemelerinde, OF insektisitlerin sütlerden %47.72-102.90 arasında geriye alındığı ortaya konulmuştur; insektisit çeşidine göre geri alım en yüksek metidatyon (%102.90), en düşük olarak da diklorvosda (%47.72) belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular benzer numune, metodoloji ve cihazlar kullanılarak yapılan çalışmalarla kıyaslandığında, Ciscato ve ark. (2002) geri alım diklorvos için %82, diazinon için %109 ve klorprifos için %112; Salas ve ark. (2003) malatyon için %47, diklorvos için %63, dimetoat için %81, diazinon için %83 ve klorprifos için %94; Bolles ve ark. (1999) klorprifos için %79-101; Battu ve ark. (2004) klorprifos ve malatyon için %93-95 olarak bulmuşlardır. Buna göre, incelenen OF insektisitler için kalıntı analizinde kullanılan yöntemin geri alım oranı diklorvos hariç, bileşik çeşidine göre farklı olmakla beraber, diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle kıyaslanabilir ölçüde yüksek ve yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

OF insektisitlerin süt numunelerine 20 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml miktarlarında katılmasıyla yapılan duyarlılık denemelerinde yöntemle sütlerde 5 ng/ml miktarda diazinon, 10 ng/ml miktarda klorprifos ve metidatyon, 20 ng/ml miktarda diklorvos, dimetoat, koumafos, 35 ng/ml miktarda malatyon kalıntısının ölçülebileceği anlaşılmıştır. Sütlerde bulunmasına izin verilen OF insektisit kalıntısı miktarları dikkate alındığında, yöntemle daha düşük miktarlardaki OF insektisit kalıntılarının ölçülebileceği görülecektir. Uyarlanan yöntemin duyarlılığının benzer yöntemlerle kıyaslanabilir ölçüde iyi olduğu söylenebilir. Şöyle ki, Ciscato ve ark. (2002) sütlerde 20 ng/ml miktarda klorprifos, 40 ng/ml miktarda diazinon ve diklorvos; Bolles ve ark. (1999) 6 ng/ml klorprifos; Salas ve ark. (2003) 9-19 ng/ml miktarlarda diazinon, diklorvos, dimetoat, klorprifos ve malatyon; Fechner ve ark. (1971b) 2 ng/ml miktarda diklorvos ve 5 ng/ml miktarda triklorfon kalıntısı ölçülebileceğini ortaya

koymuşlardır. Dimetoat ve bir ölçüde de diklorvos hariç, OF insektisit kalıntılarının ölçülmesinde kullanılan yöntemin duyarlılığının ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğu; dolayısıyla güvenilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Dimetoat kalıntılarının yöntemle ölçülememesinin fiziko-kimyasal özelliği ile ilgili olabileceği anlaşılmıştır.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yürütülen "Ulusal Kalıntı İzleme Planı" çerçevesinde sütlerde 2000 yılından beri kalıntı izlemesi yapılmaktadır; bu kapsamda yapılan kalıntı izleme çalışmalarında 2003 yılında 158, 2004 yılında 189, 2005 yılında 53, 2006 yılında 54 ve 2007 yılında 60 çiğ süt numunesi triklorfon, malatyon ve diazinon yönünden analiz edilmiş ve örneklerin hiçbirisinde kalıntıya rastlanmamıştır (ANON, 2004; ANON, 2005b; ANON, 2006a; ANON, 2006b; ANON, 2008).

Şubat 1999-Aralık 2001 arasında Ludhiana, Hindistan'da süt toplama merkezlerinden alınan 70 süt örneği, 2000 yılında mahalli satıcılardan alınan 22 süt örneği OF bileşikler (monokrotofos, metilparation, malatyon, klorprifos, kuinalfos, triazofos) yönünden gaz-sıvı kromatografi kullanılarak incelenmiştir. Analiz edilen hiçbir örnekte 0.01 mg/kg tespit limitinde kirlenme bulunmamıştır (BATTU ve ark., 2004).

Ciscato ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada süt toplama tanklarından alınan 38 çiğ süt örneği, marketlerden alınan 94 pastörize süt örneği pestisit kalıntıları yönünden ECD, NPD (nitrojen/fosfor detektörü) ve FPD ile donatılmış gaz kromatografi ile incelenmiştir. Çalışmada 70'den fazla insektisit kalıntısına bakılmıştır. Çalışmada hiçbir süt örneğinde OF, karbamat, piretroid, herbisid ve fungusid kalıntısına rastlanmamıştır.

Ege Bölgesinde Bağarası (Söke), Germencik, Nazilli, Ödemiş Süt Toplama Merkezlerinden ayda iki kez alınan toplam 96 süt örneğinin 7'sinde diklorvos, 23'ünde diazinon, 18'inde klorprifos alev fotometrik detektör ile donatılmış gaz kromatografi ile saptamıştır. Diklorvos miktarları iz miktar ile 0.011 ppm, diazinon 0.0001 ppm ile 0.038 ppm, klorprifos-etil iz miktar-0.087 ppm arasında değişmektedir. İncelemeye alınan örneklerin %8.3'ünde diklorvos, %23.9'unda diazinon, %18.75'inde klorprifos tespit etmiştir. En çok ka-

lıntı miktarı Mart, Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında alınan süt örneklerinde tespit edilmiştir. Süt örneklerinin hiçbirisinde malatyon bulunmaması bu pestisitlerin kan yolu ile karaciğere ulaştıktan sonra karışık fonksiyonlu oksidazlar, esterazlar ve karboksiesterazlar tarafından hızla oksijen analogları olan okson, sülfoksit ve sülfon gibi oksidasyon metabolitlerine dönüşmeleri ve kendilerinden 1000 defa daha fazla zehirli olan malaoksona çevrilmesine bağlanabilir (KUTER, 1994).

Bu çalışma sadece bir ürünü ve araştırmaya konu olan 7 OF insektisiti kapsamaktadır. Diğer OF insektisitler, karbamatlı ve OK insektisitler, herbisitler ve çok sayıda fungusitlerden bir ya da bir kaçının bu örneklerde olup olmadığı bilinmemektedir.

“Ulusal Kalıntı İzleme Planı” kapsamında analiz edilen süt numunelerinde OF insektisit kalıntısına rastlanmamasının birçok sebebinin olduğu ve bunların başlıcalarının şunlar olduğu söylenebilir; program kapsamında incelenen OF insektisit sayısı azdır, program kapsamında incelenen süt numunesi sayısı asgari seviyededir, Kalıntı İzleme Planı programlı ve düzenli şekilde yürütülmektedir, hayvan sahipleri konunun önemini kavramışlardır; herhangi bir kalıntı ortaya çıktığında yaptırımının ne olabileceğini bilmektedirler, Bakanlık Kalıntı İzleme Planı kapsamında çiftçi eğitimine önem vermektedir.

Gerek doğrudan insan sağlığına olan olumsuz etkileri, gerek gıda hijyeni açısından oluşturduğu problemler, gerekse de gıdalara mekanik zararlar vererek ekonomik açıdan önemli zararlara neden olması haşşere mücadelesinin temel dayanak noktasını oluşturmaktadır. Ancak, bu mücadelenin de dikkatli ve bilinçli bir şekilde yapılması gerekmektedir. Pestisit kullanımından vazgeçmek söz konusu olmadığına göre, bunların zararlı etkilerinden kaçınmak yetkili kurum tarafından yürütülen kontrol programları ve çiftçiler tarafından uygulanan ilaç tüketiminin azaltılması, hijyen, ilaç kullanılırken elde edilen sütlerin tüketime sunulmaması gibi pratik işlemler ile sütlerdeki kirlenmeyi azaltmak bir dereceye kadar olasıdır.

Teşekkür

Türkiye’de çiğ sütlerde bazı organik fosforlu insektisit kalıntılarının araştırıldığı bu çalışmada katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerine, Tez İzleme Komitesi üyelerine ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

1. Anon. (1996). COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC. (1996). 29 April 1996. *Official Journal of the European Communities*.
2. Anon. (2000a). Status of MRL Procedures. MRL assessments in the context of Council Regulation (EEC) No 2377/90. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit, EMEA/CVMP/765/99-Rev.1, 13 January 2000.
3. Anon. (2000b). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Tebliğ No: 2000/6. *T. C. Resmi Gazete*, 14.02.2000 Tarih ve 23964 Sayı.
4. Anon. (2002). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği. Tebliğ No: 2002/30. *T. C. Resmi Gazete*, 28.04.2002 Tarih ve 24739 Sayı.
5. Anon. (2004). The results and evaluation for 2003 in the residue monitoring program implemented for the live animals and primary animal products in Turkey. Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Protection and Control. Akay Cad. No: 3 06100 Bakanlıklar, Ankara, TURKEY.
6. Anon. (2005a). Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. *T. C. Resmi Gazete*, 19.01.2005 Tarih ve 25705 Sayı.
7. Anon. (2005b). 2004 Kalıntı izleme planı sonuçları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Akay Cad. No: 3 06100 Bakanlıklar, Ankara, TURKEY.
8. Anon. (2006a). Canlı hayvan ve hayvansal ürünlerde kalıntı izleme sonuçları-2006. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Akay Cad. No: 3 06100 Bakanlıklar, Ankara, TURKEY.
9. Anon. (2006b). The results and evaluation for 2005 and monitoring plan 2006 in the residue monitoring program implemented for the live animals and primary animal products in Turkey. Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Protection and Control. Akay Cad. No: 3 06100 Bakanlıklar, Ankara, TURKEY.
10. Anon. (2008). Canlı hayvan ve hayvansal ürünlerde kalıntı izleme sonuçları-2007. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Akay Cad. No: 3 06100 Bakanlıklar, Ankara, TURKEY.
11. Battu RS, Singh B, Kang BK, (2004). *Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the*

- Ludhiana district of Punjab state, India. Ecotoxicol Environ Saf.* 59, 324-331.
12. **Bolles HG, Dioxon-White HE, Peterson RK, Tomerlin JR, Day EW JR, Oliver GR,** (1999). *U. S. market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos.* J Agric Food Chem. 47 (5), 1817-1822.
 13. **Ciscato CHP, Gebara AB, Spinosa HS,** (2002). *Pesticide residues in cow milk consumed in Sao Paulo city (Brazil).* J Environ Sci Health B. 37 (4), 323-330.
 14. **Fechner G, Kretzschmann F, Ackermann H, Toepfer H,** (1971b). *Improved method for thin-layer chromatography and enzymatic determination of trichlorofon and dichlorovos residues in milk.* Monatsh Veterinaermed. 26 (22), 860-863.
 15. **Kaya S,** (2002). *Pestisitler, Gıda kirliliği, Kimyasal ve biyolojik silahlar.* Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. eds. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. İkinci baskı. Medisan Yayınevi, Ankara. s. 385-536, 777-842, 869-902.
 16. **Kaya S,** (2007). *Dış parazitleri etkileyen ilaçlar.* Kaya S. ed. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Dördüncü baskı. Medisan Yayınevi, Ankara. s. 575-655.
 17. **Kuter Ü,** (1994). *Sütlerde bazı organikfosforlu pestisitlerin ve bunların süt mamullerine geçiş oranlarının belirlenmesi üzerine bir araştırma.* Doktora Tezi, İzmir Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
 18. **Lino CM, Silveria MIND,** (1992). *Organophosphorus pesticide residues in cow's milk: levels of cis-mevinfos, methyl-parathion, and paraoxon.* Bull Environ Contam Toxicol. 49, 211-216.
 19. **Muccio AD, Pelosi P, Camoni I, Barbini DA, Dommarco R, Generali T, Ausili A,** (1996). *Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk.* J Chromatogr A. 754, 497-506.
 20. **Pagliuca G, Serraino A, Gazzoti T, Zironi E, Borsari A, Rosmini R,** (2006). *Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk.* J Dairy Res. 73, 340-344.
 21. **Rodriguez MJG, Liebanas FJA, Frenich AG, Vidal JLM, Lopez FJS,** (2005). *Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry.* Anal Bioanal Chem. 382, 164-172.
 22. **Salas JH, Gonzalez MM, Noa M, Perez NA, Diaz G, Gutierrez R, Zazueta H, Osuna I,** (2003). *Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk.* J Agric Food Chem. 51 (15), 4468-4471.
 23. **Şanlı Y,** (1999). *Veteriner klinik farmakoloji ve ilaçla sağaltım ilkeleri.* Üçüncü baskı. Ankara: Özkan Matbaacılık Ltd. Şti, s. 48, 975.
 24. **Toews DW, Mcewen SA,** (1994). *Insecticide residues in foods of animal origin: a risk assessment.* Prevent Vet Med. 20, 179-200.
 25. **Zhang Y, Muench SB, Schulze H, Perz R, Yang B, Schmid RD, Bachmann TT,** (2005). *Disposable biosensor test for organophosphate and carbamate insecticides in milk.* J Agric Food Chem. 53, 5110-5115.

Geliş Tarihi / Received: 05.01.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 14.01.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. F. İpek Keskin

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Doping Kontrol Laboratuvarı, 06020, Etlik, Ankara

E-posta: ipekkeskin@hotmail.com

Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suşu ile küflendirilmiş yemlerle beslenen kaz palazlarında (*Anser Anser domesticus*) görülen patolojik bulgular

Mehmet TUZCU¹, Abdullah DOĞAN², Nevin TUZCU³, Doğan AKÇA⁴

¹Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Adana; ²Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Kars; ³Çukurova İlçe Tarım Müdürlüğü, Adana; ⁴Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AD, Kars, Türkiye

Özet: Bu çalışmada, her bir grupta 20 hayvan bulunan toplam 60 adet 1 günlük kaz palazları kullanıldı. Bu gruplardan birinci ve ikinci gruba sırasıyla 2.5 ppm ve 5 ppm total aflatoksin içeren yem verildi. Üçüncü kontrol grubundaki palazlar ise aflatoksin içermeyen yemle beslendi. Çalışmanın 30'uncu günü bütün gruplarda kalan kaz palazları ötenazi edilerek sistemik nekropsileri yapıldı. Nekropsi sonrası alınan karaciğer, böbrek, barsak, dalak, bursa fabricius, akciğer, kalp, beyin ve beyincik örneklerinin yapılan makroskopik muayenesinden sonra, bu örnekler %10'luk tampolu formaldehit solüsyonunda tespit edilerek rutin doku takip işlemleri tamamlandıktan sonra mikroskopik olarak incelendi. Makroskopik olarak karaciğer ve böbreklerin soluklaştığı ve büyüdüğü dikkati çekerken, mikroskopik incelemelerde karaciğerde hidropikten yağlanmaya kadar değişen dejenerasyon ve safra kanal hiperplazileri ile böbrekte tubuler epitelyumda dejenerasyon gözlemlendi. Sonuç olarak aflatoksinlerin kaz palazlarında düşük dozlarda bile karaciğer ve böbrek hasarına sebep olan şiddetli toksik etkiye sahip oldukları ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Aflatoksin, kaz palazı, patoloji

The pathological findings in young goose (*Anser Anser domesticus*) fed with moulded with *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999

Summary: Sixty goose chicks, one day old, were randomly divided into 3 groups, each consisting of 20 animals: first group (2.5 ppm aflatoxin); second (5 ppm aflatoxin) and control (normal diet). At the thirtieth day of the study, tissue samples from kidney, liver, lung, heart, bursa of fabricius, intestine and brain were collected after the systemic necropsy and fixed in 10% formalin solution. Grossly, livers and kidneys of animals were pale and enlarged. In histopathological examinations, some degenerative changes from hidropic to lipidosis and bile duct hyperplasia on liver sections, tubular epithelial degenerations on kidney sections were detected. It is concluded that aflatoxins cause to severe toxic effects in goose chicks in different doses.

Keywords: Aflatoxin, goose chicks, pathology

Giriş

Aflatoksinler besinlerle birlikte alınan mikotoksinlerin bugüne kadar en fazla incelenen grubunu oluşturmaktadır. Bunun sebebi aflatoksinlerin akut veya kronik zehirlenmeler oluşturarak toplu ölümlere neden olmalarıdır. Bunun yanı sıra düşük dozlarda uzun süre alınmaları durumunda; canlı ağırlık kazancında azalma, döllülük oranında düşmeye yol açmaları ve bilinen güçlü doğal karsinojenlerden birisi olmaları aflatoksinlerin önemini artırmaktadır (ORTATATLI ve ark., 2002; KARAMAN ve ark., 2005; ÇİTİL ve ark., 2007).

Yemlerle birlikte düşük dozlarda ve uzun süre aflatoksin alımına bağlı olarak gelişen kronik aflatoksikozis olgularında görülen klinik bulgular genellikle gözden kaçır. Bununla birlikte genel olarak hayvanlarda canlı ağırlık artışında ve yem alımında azalma, kıllarda düzensizlik, anemi, depresyon, hafif derecede sarılık ve sürüde ölüm oranlarının artması gibi klinik belirtiler görülür (HAMILTON, 1982; MILLER ve ark., 1984; ROBB, 1993).

Akut ve kronik aflatoksikozis olaylarında en belli başlı patolojik bulgunun karaciğerde olduğu kaydedilmektedir (RAO ve ark., 1970; SHANK ve ark., 1971; SLOWIK ve ark., 1985). Akut

* Bu araştırma Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığınca, 2001 yılında, VF-03 no'lu proje ile desteklenmiştir.

toksikasyonun ilk dönemlerinde karaciğerin büyüdüğü, kapsülünün gerginleştiği, kenarlarının küt, kırmızı sarı mozaik görünüm aldığı, ileri safhalarında ise cam macunu rengi alarak, safra kesesi duvarının kalın jelatini görünüşte ve ödemli olduğu bildirilmektedir (MOORTHY ve ark., 1985; NİZAMLIOĞLU ve GÖZÜN, 1996).

Uzun süre düşük konsantrasyonlarda aflatoksin alınması halinde yalnızca karaciğer hacminde hafif derecede artış gözlenmektedir. Büyümenin kısmen dokudaki yağ birikiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (MOLLENHAUER, 1989). Diyetle alınan aflatoksin miktarı arttığında, karaciğerde solgunluk veya sarılık, karaciğerin kıvamında artış ile birlikte safra kesesinde ödem geliştiği bildirilmektedir (JONES ve HUNT, 1983; MOORTHY ve ark., 1985; ESPADA ve ark., 1992).

Mikroskobik olarak akut ve kronik aflatoksikozis olaylarında tanıtıcı lezyonun safra kanalı proliferasyonu olduğu kaydedilmektedir (SHANK ve ark., 1971; STOLOFF, 1977; RICHARD ve ark., 1983; SLOWIK ve ark., 1985; BİLGİÇ, 1992). Histolojik olarak hepatositler ile çekirdeklerinde büyüme ve fokal nekrozlar görülür. Karaciğer hücrelerindeki parankim ve yağ dejenerasyonlarının, toksikasyonun ileri dönemlerinde 25-30 hücreden ibaret yağ odaklarına dönüşebileceği bildirilmektedir (STOLOFF, 1977; RICHARD ve ark., 1983; SLOWIK ve ark., 1985; BİLGİÇ 1992).

Deneyisel aflatoksikozis çalışmalarında makroskobik olarak böbreklerin büyümüş ve konjesyone durumda olduğu, yer yer küçük çapta kanamalara rastlandığı çeşitli araştırmacılar tarafından kaydedilmektedir (BİLGİÇ, 1992; KIRAN ve ark., 1996; NİZAMLIOĞLU ve GÖZÜN, 1996; TUZCU ve ÇİFTÇİ, 2002). Mikroskobik olarak toksikasyonun ilk dönemlerinde proksimal tubulusların epitel hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin gözlemlendiği, daha ileri dönemlerde ise bu değişikliklerin nekrotik olaylara dönüştüğü gösterilmiştir. Glomeruluslarda mezangial hücrelerdeki hiperplaziden dolayı selülaritenin arttığı ve buna bağlı olarak glomerulusların büyüdüğü, glomerulus bazal membranlarının kalınlaştığı ve glomerulus endotel hücrelerinde şişme görüldüğü, rapor edilmektedir (BİLGİÇ, 1992; ÇİTİL ve ark., 2007).

Aflatoksikozis olaylarında dalağın konjesyone olduğu mikroskobik olarak lenfoid atrofi ile birlikte retiküler hiperplazinin görüldüğü kaydedilmektedir (KRISHNA ve ark., 1991; ESPADA ve ark., 1992). Yine benzer çalışmalarda beyinde, konjesyon, orta derecede gliosis ile birlikte miyelin dejenerasyonu ve kromatolizis, görüldüğü rapor edilmektedir (KRISHNA ve ark., 1991; SAHOO ve ark., 1991).

Bu çalışmada aflatoksin ürettiği bilinen, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suşu ile küflendirilmiş yemlerle beslenen, kaz palazlarında görülen aflatoksikozise ilişkin patolojik bulgular doz/zaman ilişkisi içerisinde incelenerek, aflatoksikozisin kaz palazlarında ortaya çıkardığı patolojik bulgular ortaya konulmuştur.

Materyal ve Metot

Aflatoksin üretimi: Aflatoksin üretimi Shotwell ve ark. (1966)'nın bildirdiği metot kullanılarak yapıldı. Bu amaçla USDA'dan (Agricultural Research Service, Peoria, IL) temin edilen *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suşu kullanıldı.

Deney grupları ve yemleme: Kars ilinin merkez ve köylerinden temin edilen 140 adet dömlü kaz yumurtasının Kars Meslek Yüksekokulu Araştırma Laboratuvarında bulunan kuluçka makinasında inkübe edilmesiyle elde edilen 60 adet kaz palazı çalışmanın materyalini oluşturdu. Palazlar, canlı ağırlık ortalamaları benzer olan ve her grupta 20 kaz palazı olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Bu gruplardan 1'inci ve 2'inci gruplar aflatoksin grupları, 3'üncü grup ise kontrol grubu olarak belirlendi. Kontrol grubu palazlara aflatoksin içermediği belirlenen karma yem verildi. Aflatoksin grubu palazlara aflatoksin bulunmadığı tespit edilen karma yem ile aflatoksin üretilen pirinçler 2.5 ppm ve 5 ppm total aflatoksin olacak şekilde karıştırılarak çalışma süresince bütün gruplara ad libitum olarak verildi.

Patolojik incelemeler: Çalışmanın 30'uncu günü bütün palazların canlı ağırlıkları tartılarak eter anestezisi altında servikal dekapitasyon ile ötenazi edildi. Makroskobik olarak incelenen hayvanların karaciğer, dalak, böbrek, beyin ve bursa fabricius'larından doku örnekleri alınıp %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Alınan dokular, daha sonra rutin laboratuvar işlem-

lerinden geçirilerek parafin blokları hazırlandı. Parafin bloklardan 6 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen & Eozin ile boyanarak mikroskobik lezyonlar değerlendirildi.

Hepatositlerdeki yağlanmayı ortaya koyabilmek için kalsiyum-formolde tespit edilen dokulardan dondurma mikrotomu ile 10 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak Sudan Black ile boyandı (DEMİR, 2001).

Bulgular

Aflatoksin üretilmesi: *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suşu ile küflendirilen pirinçlerde İ.T.K ile yapılan ölçümlerde toplam 62 ppm total aflatoksin ürettiği, üreyen total aflatoksinin yaklaşık %45'ini AF B1, %13'nü AF B2, %24'ünü AF G1, %18'ini AF G2 olduğu belirlendi.

Canlı ağırlık artış ve ölüm oranları: Kontrol ve deney gruplarının günlere göre canlı ağırlık ortalamaları ile standart hataları ve canlı ağırlık kayıp oranları Tablo 1'de verilmiştir.

Klinik bulgular: Aflatoksin verilen gruplarda yem tüketiminin azalması ile 10'uncu günden sonra belirginleşen büyüme geriliği ve ölüm oranlarının artmış olması dikkat çeken en önemli klinik bulgu idi. Aflatoksin verilen bütün palazlarda tüyler düzensizleşmiş ve arkaları koyu renkli gaita ile kirlenmişti. Çalışmanın son haftası içerisinde daha da belirginleşen yürüme güçlüğü, kanatlarda düşme, felçler ve vücudun gergin tutuluşu ile boynun geriye doğru bükülü tutulması da dikkat çeken diğer klinik bulgulardı.

Karaciğer ağırlıkları: Kontrol grubu ve deneme grubu palazların deney sonunda ötenazi edildikten sonraki karaciğer ağırlıkları ve bunların palazların canlı ağırlıklarına oranları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Kontrol grubu ve deneme grubu palazların karaciğer ağırlıkları ile canlı ağırlıklarına oranları.

Gruplar	n	Karaciğer ağırlıkları ort. (gr)	Karaciğer ağırlık ort./canlı ağırlık ort. (%)
Kontrol	19	32.8 ± 0.9	5.85
2.5 ppm	14	24.2 ± 0.7	9.29
5 ppm	9	18.8 ± 0.7	9.90

Makroskobik bulgular: Çalışmanın sonunda aflatoksin verilen gruplardaki palazların karaciğerlerinin tamamının keskin kenarlarının kütleştiği, büyük çoğunluğunun renginin solgun veya sarımtırak olduğu, (Resim 1B-1C) ve bazı olgularda ise peteşiel kanamaların bulunduğu dikkati çekti (Resim 1C).

Aflatoksin verilen gruplardaki böbreklerin büyümüş olduğu kesit yüzünün taşkınca ve ıslak görüldüğü ve tamamının solgun renkte olduğu belirlendi. Yine bursa fabricius'ların tamamının kontrol grubuna kıyasla küçük olduğu (Resim 1D ve 1E) ve her iki gruptan birer olguda da kanamalı olduğu dikkati çekti.

Tablo 1. Çalışma gruplarının günlere göre ölüm oranları, canlı ağırlık artış ortalamaları ile canlı ağırlık kayıp oranları.

Gruplar	n	1. gün (gr)	n	10. gün (gr)	n	30. gün (gr)	Ölüm oranı	Kontrole göre canlı ağırlık kaybı (%)
Kontrol	20	95.8 ± 1.5	19	320.3 ± 32.1	19	560.2 ± 52.2	1/20	100
2.5 ppm	20	96.2 ± 0.9	16	218.6 ± 21.6	14	260.4 ± 24.6	6/20	35.35
5 ppm	20	96.8 ± 2.0	13	158.5 ± 20.8	9	189.8 ± 28.8	11/20	20.02

Mikroskopik bulgular: Çalışmada aflatoksin verilen bütün palazların karaciğerlerinde belirgin bir hipereminin geliştiği ve hepatositlerin sitoplazmalarının bulanıklaştığı görüldü. Dejeneratif değişiklikler ile birlikte özellikle intermedier bölgede daha yoğun olmak üzere lobcuğun her yerinde iri vakuollere rastlandı. Ayrıca karaciğer paransimine dağılmış olarak görülen multifokal nekrozlarda belirlendi (Resim 2). Hepatositlerin sitoplazmasında iri yağ vakuollerin bulunduğu, yer yer de bir kaç vakuolün birleşerek küçük yağlanma alanları yaptıkları dikkati çekti. Yapılan Sudan Black boyamalarda bu vakuollerin yağ vakuolleri olduğu belirlendi (Resim 2). Bu değişikliklerle ilgili olarak lobcuklardaki Remark kordonlarının dizilişi de bozulmuştu. Özellikle 2.5 ppm aflatoksin alan grupta olmak üzere her iki aflatoksin grubundaki palazların karaciğerlerinde bazofilik sitoplazmalı, daha küçük çekirdekli rejenere hepatositlere de rastlandı. Yine bu grupta safra kanallarının genişlediği, safra kanallarının sayısında artış olduğu, epitellerinde hiperplazi geliştiği dikkati çekti. Bu bulgulara ilave olarak çoğunlukla V. sentralislerin etrafında olmak üzere karaciğer paransimine yayılmış olarak izlenen fokal mononükleer hücre infiltrasyonları da belirlendi.

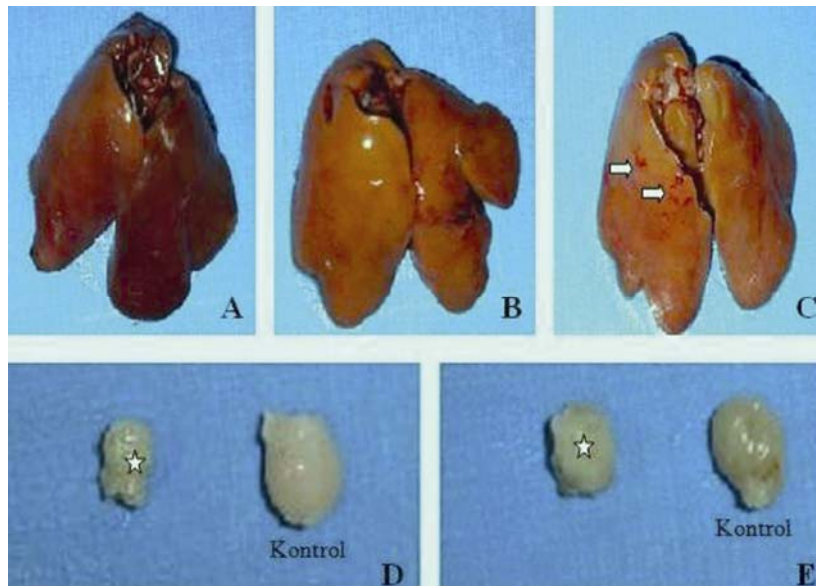
Aflatoksin verilen bütün palazların böbrek tubuluslarının lümenlerinin eozinofilik homojen bir

materyal ile dolu olduğu, tubulusları döşeyen epitellerin şişkin ve sitoplazmasının bulanık görüldüğü çekirdeklerinin yoğun boyandığı ve farklı büyüklükte oldukları belirlendi. Beş ppm aflatoksin alan gruptaki palazlarda daha şiddetli olmak üzere glomeruluslarda mezangiyal hücrelerde artış ve Bowman kapsülünün parietal yaprağının kalınlaştığı dikkati çekti. Yine her iki gruptaki bazı palazlarda intertubuler bölgelerde kanamaların bulunduğu görüldü. 2.5 ppm aflatoksin alan palazlardan biri hariç diğer bütün çalışma gurubu palazların böbreklerinde bazı tubulusların yassı epitelle döşeli olduğu ve bununla ilgili olarak lümenlerinin değişen derecelerde genişlediği dikkati çekti.

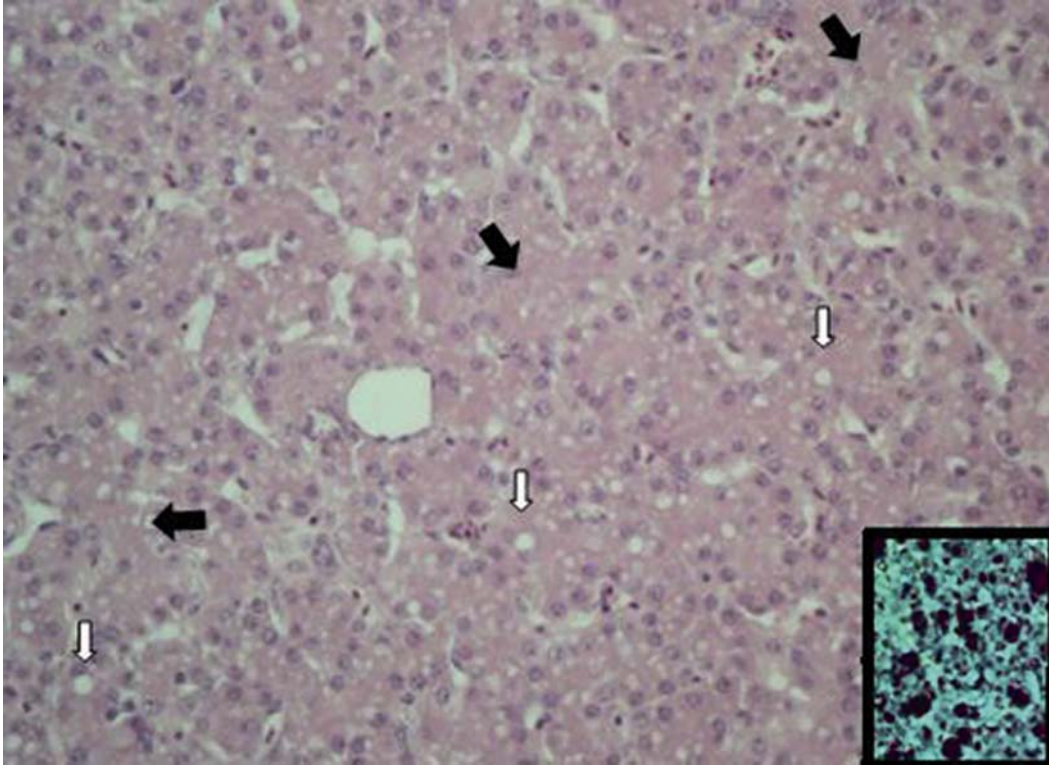
Aflatoksin alan palazların dalaklarında kırmızı pulpanın normal histolojik yapısını koruduğu, ancak beyaz pulpadaki periarterioler lenfoid dokunun boşalmış olduğu mikroskopik olarak belirlendi.

Bursa fabricius'larda lenf foliküllerinde boşalma (Resim 3), lenfosit sayısında azalma ve interfolliküler epitelde dökülme belirlendi.

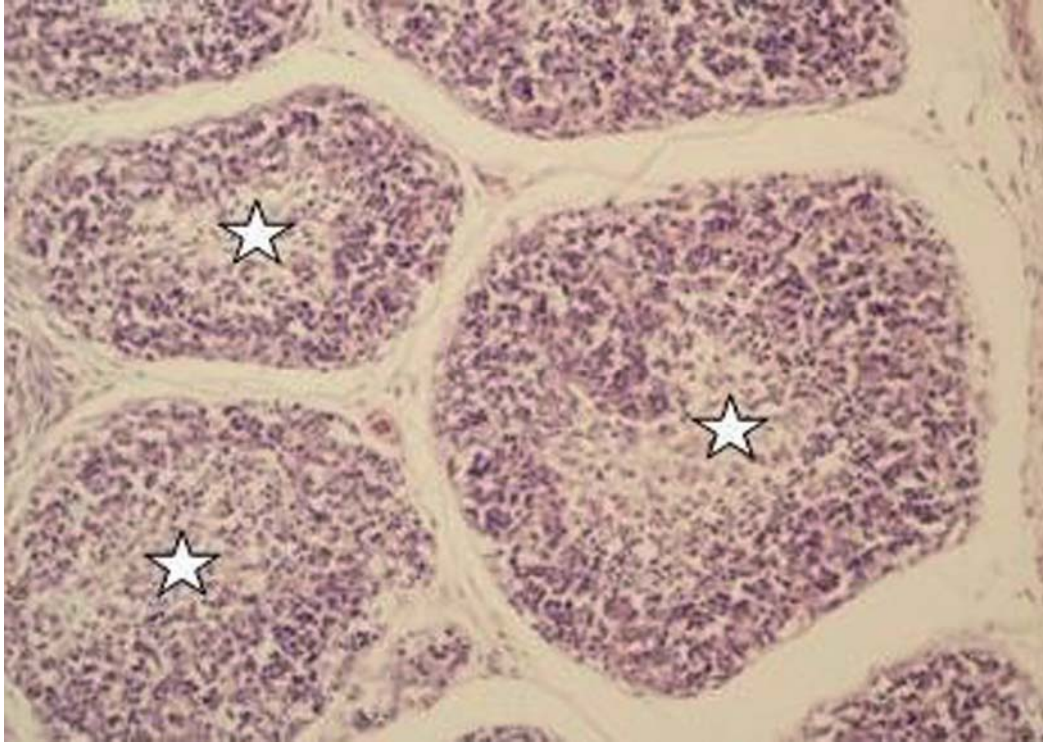
Aflatoksin içeren diyetle beslenen palazların beyinlerinin mikroskopik incelemesinde bütün palazlarda dikkati çeken en önemli bulgunun hiperemi ve ödem olduğu ayrıca bazı beyinlerin incelenmesinde de nöronlarda dejenerasyonların varlığı dikkati çekti.



Resim 1. Kontrol grubundan bir palazın karaciğeri (A) karaciğerde solgun renk 2.5 ppm aflatoksin verilen grup (B), karaciğerde solgun renk ve ekimotik kanamalar (oklar) 5 ppm aflatoksin verilen grup (C), 5 ppm aflatoksin verilen grup, bursa fabriciusda atrofi (yıldız) (D) 2.5 ppm aflatoksin verilen grup, bursa fabriciusda atrofi (yıldız) (E).



Resim 2. 5 ppm aflatoxin verilen kaz palazlarının karaciğerlerinde multifokal nekroz alanları (siyah oklar), hepatositlerde yağ vakuolleri (Beyaz oklar) Hematoksilen&Eozin x 300, Hepatositlerde yağ vakuolleri (küçük resim), Sudan Black x 420.



Resim 3. 5 ppm aflatoxin verilen grup bursa fabriciuslarında folliküllerde boşalma (yıldız) Hematoksilen&Eozin x 300.

Tartışma ve Sonuç

Yemlerinde 2.5 ppm ile 3.5 ppm arasında aflatoksin bulunan broiler civcivlerin canlı ağırlık artışlarında %12-57 arasında değişen düşüşlerin olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (CAMPBELL ve ark., 1983; KIRAN ve ark., 1996). Yapılan bu çalışmada da kaydedilen canlı ağırlık artış oranları, araştırmacıların (CAMPBELL ve ark., 1983; KIRAN ve ark., 1996) belirttiği aflatoksinlerin canlı ağırlık artışını azalttığı yönündeki görüşlerini açık bir şekilde desteklemektedir.

Aflatoksin alan palazların karaciğer ağırlıklarının kontrol grubu palazların karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırılmasında aflatoksin alan gruplar ile kontrol grubu palazların karaciğer ağırlıkları arasında %99.9 güven sınırında istatistiki olarak fark bulunması, Bilgiç (1992)'in bildirdiği, yemle birlikte 2.5 ppm'in üzerinde alınan aflatoksinin karaciğer ağırlıkları üzerine etkili olduğu kanısını doğrulamaktadır. Çalışmada karaciğer ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı karaciğer ağırlığı lehine değişmiş olması aflatoksin miktarının besi performansını negatif yönde etkilemesi ile izah edilebilir.

Deneyisel aflatoksikozis oluşturulan çalışmalarda otopsi bulgusu olarak karaciğerin büyüdüğü, kenarlarının kütleştiği, renginin solgunlaştığı veya cam macunu renginde görüldüğü belirtilmektedir (MOORTHY ve ark., 1985; BİLGİÇ, 1992). Yüksek dozda aflatoksin yedirilerek yapılan çalışmalarda büyüme ve solgunlaşmaya ek olarak karaciğer yüzeyindeki peteşiel ve/veya ekimotik kanamalara da dikkat çekilmektedir (MOORTHY ve ark., 1985; KIRAN ve ark., 1996; TUZCU ve ÇİFTÇİ, 2002). Çalışmada aflatoksin yedirilen bütün gruplardaki palazların karaciğerlerinde görülen makroskobik bulgular araştırmacıların (MOORTHY ve ark., 1985; KIRAN ve ark., 1996) kaydettikleri ile benzer bulgulardır.

Farklı hayvanlarda oluşturulan deneyisel aflatoksikozis olgularının birçoğunda araştırmacılar, (HALDEREN ve ark., 1989; SULIMAN ve ark., 1987; SAHOO ve ark., 1991) böbreklerin büyüdüğünü ve kesit yüzlerinin kanamalı görünümde olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da böbreklerin şişkin ve büyümüş oluşu ve solgun renkte görünümü araştırmacıların bildirdiği bulgularla uyumludur.

Suliman ve ark. (1987), ördek hepatositlerinde aflatoksin B2 ile hücrel makromoleküller arasında oluşan kovalent bağların ratlardan daha fazla olduğunu bildirmektedir. Bu durum hücrel makromoleküller ile aflatoksinler arasında oluşan bağların sayıları ile toksisite ve karsinojenik etkiler arasında pozitif bir korelasyonun olduğu şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada elde edilen patolojik bulguların ördeklerin akut aflatoksikozis olaylarında ortaya çıkan bulgular kadar şiddetli olması (SLOWIK ve ark., 1985) ördeklerle benzer hayat ortamına ve benzer anatomik özelliklere sahip kaz palazlarının ördekler gibi aflatoksikozise yüksek seviyede duyarlı olan grup içine dahil edilebileceğini göstermektedir.

Aflatoksinlerin toksik etkilerinin özellikle de aflatoksin B1'in intraselüler makromoleküllere karşı olan aşırı ilgisinden dolayı nükleer DNA'ya bağlanmak suretiyle öncelikle RNA ve daha sonra da enzim ve protein sentezini inhibe ederek ortaya çıktığı kaydedilmektedir (HAMILTON, 1982). Aslında aflatoksin B1'in sitotoksik ve karsinojenik etkilerinin özgün molekülde değil, 2-3 epoksit şekli ile muhtemelen de aflatoksin Q1, P1, M1 ve aflatoksikolon 2-3 epoksit metabolitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (ZACHARY ve ark., 1980). Epoksit şeklindeki etkin metabolitlerin özellikle hepatik mikrozomal stokrom P450'ye bağımlı karışık işlevli oksijenaz sistemi (MFO) etkinliği ile özgün aflatoksinlerden sentezlendiği saptanmıştır (OĞUZ, 1997). Bu nedenle aflatoksinlerin özellikle hepatositlerde lezyona neden olduğu kaydedilmektedir (MOORTHY ve ark., 1985; DAFALLA ve ark., 1987). Bu verilere uygun olarak çalışmada, aflatoksin alan palazların karaciğerlerinde belirlenen patolojik değişiklikler diğer organlara oranla daha belirgin olarak görüldü.

Çeşitli araştırmacılar (SAHOO ve ark., 1993; DAFALLA ve ark., 1987; BİLGİÇ 1992) tarafından aflatoksikozis olaylarında hepatosit çekirdeklerinin büyüdüğü, çekirdekçiğin belirginleştiği, marjinal hiperkromazi görüldüğü, çekirdeğin kromatinden fakir içi boş ve şeffaf görünümde olduğu yer yer de çift çekirdekli hepatositlerin görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada da genel olarak aflatoksin verilen gruplarda benzer şekilde marjinal hiperkromazili, çekirdekiçiği belirgin iri hepatositlere rastlanılmıştır. Slowik ve ark. (1985),

ördek yavrularına 1.5 miligram aflatoksin B1'i peros yolla vererek yaptıkları çalışmada safra kanallarında proliferasyon belirlediklerini, Yakışık (1992), 5 mikrogram/gün aflatoksin B1 dozunun civcivlerde 60'ıncı günde safra kanallarında proliferasyon ve epitellerinde hiperplaziye sebep olduğunu bildirmektedir. Çalışmada belirlenen safra kanalı epitellerindeki hiperplazi ve safra kanalı sayısının artışı literatürle uyum göstermektedir.

Aflatoksin verilen bütün grupların böbreklerinde gözlenen tubul epitellerindeki dejeneratif değişiklikler ile glomeruluslarda selülaritenin artması ve Bowman kapsülünün parietal yaprağındaki kalınlaşmalar ile intertubuler kanamalar gibi patolojik değişiklikler diğer araştırmacıların (SAHOO ve ark., 1991; ESPADA ve ark., 1992; KIRAN ve ark., 1996; NİZAMLIOĞLU ve GÖZÜN, 1996) kaydettiklerine benzer bulgulardır.

Aflatoksin alan gruplarda dalakta periarterioler lenfoid dokunun boşalması ile bursa fabricius'da lenfoid tükenmenin görülmesi daha önce, Espada ve ark. (1992)'nin 3 ppm aflatoksin ile, Kıran ve ark. (1998)'nin 2.5 ppm aflatoksin ile, Okoye ve ark. (1988)'nin 2.4 ppm aflatoksinle, kontamine yemle beslenen broilerler ile yaptıkları çalışmalarda elde edilen bulgularla benzerdir.

Sahoo ve ark. (1991), bu çalışmada gözlenen palazlarda beyin ve beyincikte görülen hiperemi, neuronlarda dejeneratif değişiklikler ve gliosis gibi patolojik değişiklikleri tavşanlarda bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kars ve yöresinde önemli bir hayvancılık kolu olan ve çoğunlukla artık gıdalarla beslenen kazlarda önemli bir risk olan aflatoksikozisin teşhisinde oldukça önemli olan patolojik bulgular ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Bilgiç N ve Türkmen B, (1993). *Gökkuşluğu alabalıklarında (Salmo gairdneri) aflatoksikosis olaylarında karaciğerde patolojik bulgular*. Türk Vet Hek Derg. 5, (5), 30-33.
2. Bilgiç N, (1992). *Akut aflatoksikosis olaylarında patolojik bulgular*. Türk Vet Hek Derg. 4 (3), 38-40.
3. Campbell TC, May JR, Dull WE, Doerr JA, (1983). *Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis*. Poultry Sci. 62, 2138-2144.
4. Çitil M, Karapehlivan M, Tuzcu M, Doğan A, Uzlu E, Atakişi E, Kanıcı A, Uzun M, (2007). *Kronik aflatoksikozis oluşturulan bildircinlerde (Coturnix coturnix japonica) L-Karnitin, biyokimyasal, hematolo-*

- jik ve patolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 13 (1) 75-85.
5. Dafalla R, Yağı AI and Adam S.E, (1987). *Experimentally aflatoxicosis in hybro type chicks: Sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes*. Vet Hum Toxicol. 29 (3), 222-226.
 6. Demir R, (2001). *Histolojik boyama teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye.
 7. Espada Y, Domingo M, Gomez J and Calvo, MA, (1992). *Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B1 in broiler chickens*. Res Vet Sci. 53, 275-279.
 8. Halderen AV, Green JR, Marasass WFO, Thiel PG and Stockenstrom S, (1989). *A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the western cape province*. JS Mr Vet Ass. 60 (4), 210-211.
 9. Hamilton PB, (1982). *Mycotoxins and farm animals*. Ref Vet. 39 (1-2), 17-45.
 10. Jones TC and Hunt RD, (1983). *Veterinary Pathology* 5th ed, Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
 11. Karaman M, Basmacıoğlu H, Ortatatlı M, Oğuz H, (2005). *Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology*. Br Poult Sci. 46 (3) 394-400.
 12. Krishna L, Rajinder KD and Vald J, (1991). *An outbreak of aflatoxicosis in angora rabbits*. Vet. Human Toxicol. 33 (2), 159-161.
 13. Kıran MM, Demet Ö, Ortatatlı M ve Oğuz H, (1996). *Broilerlerde deneysel aflatoksikoziste meydana gelen lezyonlar ve adsorban olarak kullanılan MycofixR Plus (PVPP etken maddeli)'nin toksisiteyi azaltıcı etkisi üzerine patolojik incelemeler, III.Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu. 3-5 Ekim 1996, Manisa*.
 14. Miller MD, Clark JD, Hatch RC and Jain A, (1984). *Caprine aflatoxicosis: serum electrophoresis and pathologic changes*. Amer Vet Med Assoc. 45 (6), 1136-1141.
 15. Mollenhauer BB, Corrier DE, Huff WE, Kubena LF, Harvey RB and Droleskey RE, (1989). *Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin*. Am J Vet Res. 50 (5), 771-777.
 16. Moorthy AS, Mahendar M and Rao PR, (1985). *Hepatopathology in experimental aflatoxicosis in chickens*. Ind J Anim Sci. 55 (8), 629-632.
 17. Nizamlioğlu F ve Gözün H, (1996). *Yemlerinde aflatoksin tesbit edilen kanatlıların karaciğer ve böbreklerinde meydana gelen patolojik değişiklikler*. Veterinarium. 7 (12), 46-49.
 18. Oğuz H, (1997). *Broyler yemine katılan polivinilpoliprolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkilerinin belirlenmesi*. Doktora Tezi, S.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
 19. Okoye JAO, Asuzu IU and Gugnani HC, (1988). *Paralysis and lameness associated with aflatoxicosis in broilers*. Avian Pathology. 17 (3), 731-734.
 20. Ortatatlı M, Çiftçi, M.K., Tuzcu, M., Kaya, A, (2002). *The detection of pathological findings in testes and plasma testosterone level on roosters fed diet with aflatoxin*. Res in Vet Science. 72, 36-39.
 21. Rao SK and Gehring P, (1970). *Acute toxicity of aflatoxin B1 in monkeys*. Toxicol Appl Pharm. 19, 169-175.

22. **Richard JL, Pier AC, Stubblefield RD, Shotwell OL, Lyon RL and Cutlip RC**, (1983). *Effect of feeding com naturally contaminated with aflatoxin on feed efftciency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, aud on tissue residues in steers*. Am J Vet Res. 44 (7), 1294-1299.
23. **Robb J**, (1993). Mycotoxins, In Practice, November, 278-279.
24. **Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Chftran K and Sıkdar A**, (1991). *Pathology of Experimental Aflatoxicosis in Rabbits*. Ind J of Anim Sci. 63 (3), 268-273.
25. **Shank RC, Johnsen OD, Tanticharoenyos P, Wooding WL and Bourgeois HC**, (1971). *Acute toxicity of aflatoxin B1 in the macaque monkey*. Toxicol Appl Pharm. 20, 227- 231.
26. **Shotwell OL, Hesseltine CV, Stubblefield RD and Sorenson WG**, (1966). *Production of aflatoxin on rice*. Applied Microbiol. 14 (3), 425-429.
27. **Slowik J, Graczyk S and Madej JA**, (1985). *The effect of a single dose of aflatoxin B1 on the value of nucleolar index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa fabricii, suprarenal glands and spleen in ducklings*. Felio Histochem et Cytobiol. 23 (1-2), 71-81.
28. **Stoloff L**, (1977). Aflatoxin an overview. in: mycotoxin in human and animal health. Pathotox Publ. Inc, Park Forest South, Illinois, 7-28.
29. **Suliman BH, Mohamed FA, Avadelsied AN and Shommein MA**, (1987). *Acute mycotoxicosis in sheep*. Vet Hum Toxicol. 29 (3), 241-243.
30. **Tuzcu M., Çiftçi M.K.**, (2002). *Aspergillus parasiticus NRRL 2999 suşu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular*. I Veteriner Patoloji Kongresi, 12-13 Eylül 2002, Konya.
31. **Yakışık M**, (1992). *Aflatoxin B1 verilmiş newcastle aşıllı civcivlerde karaciğer parankimi üzerinde ışık mikroskopik incelemeler*. UÜ Vet Fak Derg. 11 (2), 43-51.
32. **Zachary A, Wong H and Dennis PH**, (1980). *The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in monkey, rat and Mouse*. Toxicol Applied Pharm. 55, 115-125.

Geliş Tarihi / Received: 12.10.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 03.12.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. Mehmet Tuzcu

Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,

Adana, Türkiye

E-posta: mtuzcu42@hotmail.com

Investigation of *Taylorella equigenitalis* from thoroughbred stallion genital swabs by direct polymerase chain reaction and culture method

H. Kaan MÜŞTAK¹, Elçin GÜNAYDIN², Asiye DAKMAN², Uğur KÜÇÜKAYAN¹

¹Breeding Disease Laboratory; ²Poultry Diseases Research and Diagnosis Laboratory, Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara, Turkey

Summary: In this study, classical culture method and a direct polymerase chain reaction (direct-PCR) assay was applied to urethral fossa and sinus swabs taken from 25 thoroughbred stallion racehorses to detect *Taylorella equigenitalis* responsible for contagious equine metritis (CEM). *T. equigenitalis* was not isolated from any of the samples and was not detected by direct-PCR.

Keywords: Culture, direct-PCR, stallion, *Taylorella equigenitalis*

Safkan yarış aygırlarından alınan genital svaplarda direkt polimeraz zincir reaksiyonu ve kültür yöntemi ile *Taylorella equigenitalis*'in araştırılması

Özet: Bu çalışmada 25 safkan yarış aygırından alınan uretral fossa ve sinus svaplarında, direkt polimeraz zincir reaksiyonu (direkt-PCR) ve klasik kültür yöntemleri ile kontajiyöz equine metritis (CEM)'in etkeni olan *Taylorella equigenitalis* varlığı aranmıştır. Alınan örneklerden *T. equigenitalis* izole edilemediği gibi direkt-PCR yöntemi ile de tespit edilememiştir.

Anahtar sözcükler: Aygır, direkt-PCR, kültür, *Taylorella equigenitalis*

Introduction

Contagious equine metritis (CEM) is a highly contagious venereal non-systemic infection of horses. Clinical signs are seen only in mares with a slight to copious mucopurulent vaginal discharge and a variable cervicitis, endometritis and vaginitis findings following temporary infertility which lead to economic loss in horse breeding. Unlike the mares, stallions exposed to CEM do not develop clinical signs but they carry the infection and pass it to the mares during mating (OIE, 2008).

The causative agent of CEM, *T. equigenitalis*, is a Gram negative, microaerophilic, non-motile organism that needs fastidious growth requirements. Bacteriological, serological and recently developed molecular techniques can be used in diagnosis of CEM but definitive diagnosis is isolation of the agent from swab samples taken from urogenital membranes of mares and stallions. Swabs must be sent to the laboratory at 4°C in 48 hours with a transport medium (Amies medium) that includes active charcoal (WATSON, 1997).

These time and temperature settings must be obeyed in order not to decline the number of *T. equigenitalis* on swab samples. The urogenital membranes of stallions or mares are colonized by genital flora bacteria and fungi that inhibits the growth of *T. equigenitalis* on culture agar plates. Amphotericin B, clindamycin and trimethoprim is added to the culture medium to prevent contamination with these commensal microorganisms. After culturing the organism, daily inspection is needed during the incubation period which requires 72 hours to 14 days (OIE, 2008).

Jang et al. (2001) reported a second species, *Taylorella asinigenitalis* within the genus *Taylorella* which they isolated from genital tracts of donkeys. The new species has not been associated with naturally occurring disease. Differentiation through bacterial isolation of these two species is difficult because of the similar colonial appearance and identical biochemical test results.

To overcome the difficulties in isolation and identification of *T. equigenitalis* and its differentiation from *T. asinigenitalis*, several PCR assays

were developed and used in many countries. As well as acutely infected mares, PCR assays can also be used to identify carrier stallions. It was reported that PCR has a much higher rate of detection than bacteriological culture methods and can detect small numbers of *T. equigenitalis* through commensal bacteria from urogenital tract of horses (ANZAI et al., 1999; BLEUMINK-PLUYM et al., 1994; DUQUESNE et al., 2007). PCR is a rapid, specific and sensitive method for identification of *T. equigenitalis*. PCR was also used in the eradication of CEM in Japan and successful results were obtained (ANZAI et al., 2002). In this study, we aimed to identify *T. equigenitalis* from thoroughbred stallion genital swabs by direct-PCR assay.

Material and Method

Isolation and identification: Urethral fossa and sinus swab samples with Amies medium taken from 25 stallions sent to our department in cold chain and cultured immediately. Eugin agar with 5-10% lysed horse blood was used for bacteriological culture. Each swab sample inoculated on agar plates with 3 different compositions including; 1, amphotericin-B (5 mg/l); 2, amphotericin-B (5 mg/l), streptomycin (200 µg/ml); 3, amphotericin-B (5 mg/l), clindamycin (5 mg/l), trimethoprim (1 mg/l) respectively and incubated at 37°C in 5-10% (v/v) CO₂ in air. Plates were inspected daily for 14 days. Colonies became visible in 72 hours were not take into consideration. Suspected colonies were Gram stained and examined with catalase, phosphatase and oxidase tests. *T. equigenitalis* Kentucky 188 (K-188) strain was used as a positive control to check the accuracy of culture method. Cultured swab samples were stored at 4°C for further examination with direct-PCR.

Direct polymerase chain reaction (Direct-PCR):

A swab sample taken from urethral fossa of a stallion was dipped in an ependorf, containing *T. equigenitalis* K-188 strain which was suspended

with 500 µl sterile distilled water in order to test the direct-PCR with an experimental positive control. After being stored at 4°C in Amies transport medium for 24 hours, the positive control swab was suspended in 500 µl sterile distilled water at 37°C for 10 minutes. Other 25 swab samples were suspended and incubated like the positive control swab. DNA was extracted from these cell suspensions using DNeasy Blood & Tissue Kit[®] of Qiagen (product number: 69506) according to the manufacturer directives. Extracted DNA was stored at -20°C.

Te1:CAGCATAAGGAGAGCTTGCTTTTCT and Te2:GTCCATGGTATTAACACAAAC primers were used to amplify a 413-bp 16S rDNA sequence by PCR (DUQUESNE et al., 2007). PCR reaction was performed by using Fermentas Taq DNA Polymerase (recombinant) Kit (product number: EP0402). The 25 µl reaction solution contained 2.5 µl 10 × PCR buffer with KCl, 1.5 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTP (Qiagen), 0.5 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl), 1 µl of each primer (20 pmol/ µl), 16 µl deionized water and 2 µl template DNA. PCR incubations were performed in Sensequest thermal cycler with an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles with denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s. Final extension was done at 72°C for 5 min at the end of last cycle. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide under UV transluminator.

Findings

T. equigenitalis was not isolated from swab samples taken from urethral fossa and sinus of 25 stallions in bacteriological culture. DNA extracted from culture and experimental swab sample of *T. equigenitalis* K-188 strain produced a 413-bp amplification fragment at agarose gel electrophoresis. On the other hand, urethral fossa and sinus swab samples taken from 25 stallions were found to be negative in direct-PCR (Figure).

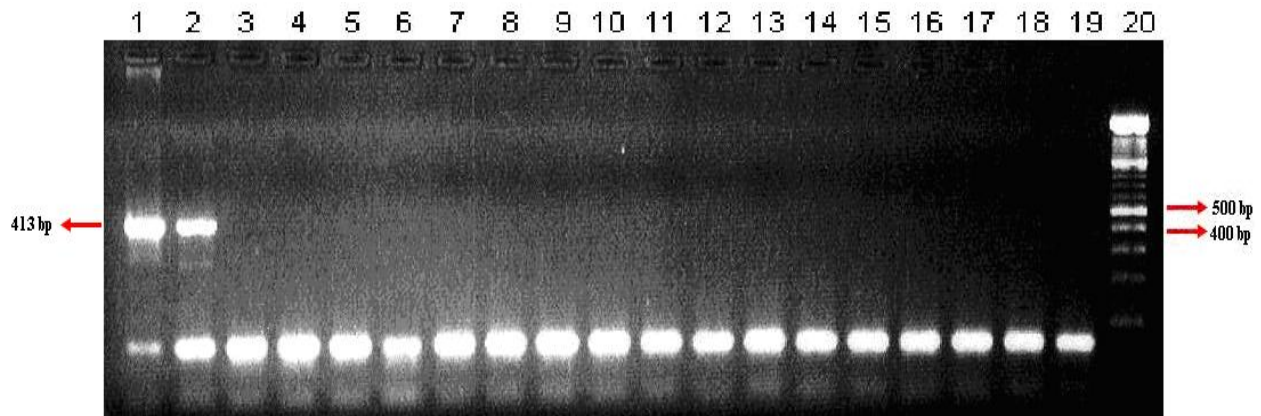


Figure. PCR amplification results. Lane 1: Positive control with *T. equigenitalis* K-188 strain genomic DNA (413-bp); lane 2: Experimental positive control swab sample; lane 3-19: Negative results belong to swab samples taken from urethral fossa and sinus of stallions; lane 20: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Latvia).

Discussion and Conclusion

CEM was first described in the United Kingdom in 1977 (CROWHURST, 1977), after which it was spread through a number of countries worldwide. In Turkey; the agent of CEM, *T. equigenitalis*, was first described in 2001 by Ozgur et al. (2001b) from clitoral fossa swabs of 2 mares by bacteriological culture of 81 intrauterine and 39 clitoral fossa swab samples of 120 thoroughbred mares which had either endometritis or an infertility problem.

Although it has many disadvantages, bacteriological culture is the main tool for definitive diagnosis of *T. equigenitalis*. Several PCR assays have already been developed with advantages of rapid and definitive diagnosis of *T. equigenitalis* and its discrimination from *T. asinigenitalis*. In this study, we chose the method and primers that Duquesne et al. (2007) used, because, these primers distinguish *T. equigenitalis* from *T. asinigenitalis*, and do not amplify DNA's of equine urogenital tract commensal bacteria (*Streptococcus zooepidemicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia liquefaciens* and *Escherichia coli*). Also authors found the sensitivity of PCR assay as 10 CFU which can not be detected by bacteriological methods.

In Turkey, the presence of *T. equigenitalis* was well demonstrated by former studies in which serological tests (ÖZGÜR et al., 2001a; ERDEĞER et al., 2002) and bacteriological culture methods (ÖZGÜR et al., 2001b) were used, but this is the first study that PCR assay was used for investiga-

tion of CEM in Turkey. In this study, we aimed to compare bacteriological culture and direct-PCR results and test the usefulness of method in order to use in our laboratory for routine diagnosis.

We could not detect *T. equigenitalis* with both culture and direct-PCR, but it is understood that the result we obtained is due to the swab material which was low in number and taken from healthy thoroughbred stallions. In order to get valid results and increase the probability of getting positive results we have to plan an extensive study using swab materials taken from suspected carrier stallions and mares which have endometritis or infertility problem. Nevertheless, results obtained from positive controls showed that direct-PCR assay used in this study was successful and it is useful in routine diagnosis of CEM.

References

1. Anzai T, Eguchi M, Sekizaki T, Kamada M, Yamamoto K, Okuda T, (1999). Development of a PCR test for rapid diagnosis of contagious equine metritis. J Vet Med Sci. 61, 1287-1292.
2. Anzai T, Wada R, Okuda T, Aoki T, (2002). Evaluation of field application of PCR in the eradication of contagious equine metritis from Japan. J Vet Med Sci. 64, 999-1002.
3. Bleumink-Pluym NMC, Werdler MEB, Houwers DJ, Parlevliet JM, Colenbrander B, van der Zeijst BAM, (1994). Development and evaluation of PCR test for detection of *Taylorella equigenitalis*. J Clin Microbiol. 32, 893-896.
4. Crowhurst RC, (1977). Genital infection in mares. Vet Rec. 100, 476.
5. Duquesne F, Pronost S, Laugier C, Petry S, (2007). Identification of *Taylorella equigenitalis* responsible for con-

- tagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction. Res Vet Sci. 82, 47-49.*
6. **Erdeğer J, Akan M, Altay G, Demirel M,** (2002). *Atlarda infertiliteye neden olan Taylorella equigenitalis'in bakteriyolojik ve serolojik tanısı. Vet J Ank Univ. 49, 39-44.*
 7. **Jang SS, Donahue JM, Arata AB, Goris J, Hansen LM, Earley DL, Vandamme PA, Timoney PJ, Hirsh DC,** (2001). *Taylorella asinigenitalis sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (Equus asinus). Int J Syst Evol Microbiol. 51, 971-976.*
 8. **Office International des Epizooties (OIE),** (2008). *Contagious equine metritis, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 2.5.2., p. 838-844.*
 9. **Özgür NY, Eguchi M, Anzai T, İkiz S, Ilgaz A,** (2001a). *İnfertil ya da endometritisli kısıraklarda rutin contagious equine metritis (CEM) taramalarında pasif hemaglutinasyon (PHA) testi ve ELISA'nın karşılaştırılması ve değerlendirilmesi. Turk J Vet Anim Sci. 25, 989-994.*
 10. **Özgür NY, İkiz S, Carioglu B, Kılıncarslan R, Yılmaz H, Akay O, Ilgaz A,** (2001b). *Contagious equine metritis in Turkey: first isolation of Taylorella equigenitalis from mares. Vet Rec. 149, 120-122.*
 11. **Watson ED,** (1997). *Swabbing protocols in screening for contagious equine metritis. Vet Rec. 140, 268-271.*

Geliş Tarihi / Received: 14.10.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 16.11.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. H. Kaan Müştak

Central Veterinary Control and Research Institute,

Breeding Disease Laboratory,

06020, Etlik, Ankara, Turkey

E-posta: kaanmustak@gmail.com

Prevalence of *Neospora caninum* in cows with stillbirth and abortion

F. Çiğdem PIŞKIN¹, Armağan Erdem ÜTÜK¹

¹Parasitology and Bee Diseases Laboratory, Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara, Turkey

Summary: The aim of this study was to determine the prevalence of *Neospora caninum* in cows with stillbirth and abortion. For this aim a total of 134 sera was collected and divided into two groups under abortion and stillborn which were tested for antibodies against *N. caninum* using a commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA) kit (VMRD, USA). Abortion group was divided into 90-150, 150-210, 210-260 day groups. Cows expelling their fetus after 260 days of gestation were accepted as stillbirth group. Antibodies against *N. caninum* were detected as 47 out of 134 (35.07%) sera. Mean prevalences of abortion and stillbirth group were 24.44% and 56.81%, respectively. In the abortion group, prevalences were detected as 23.07% for 90-150 day group, 18.51% for 150-210 day group and 29.72% for 210-260 day group.

Keywords: Abortion, *Neospora caninum*, prevalence, stillbirth

Ölü doğum ve abort yapan ineklerde *Neospora caninum* prevalansı

Özet: Bu çalışma abort ve ölü doğum yapan ineklerde *Neospora caninum*'un prevalansını belirlemek amacıyla yapıldı. Bu amaçla iki gruba (abort ve ölü doğum) ayrılmış toplam 134 serum, ticari kompetatif ELISA kiti (c-ELISA) ile *N. caninum*'a karşı oluşmuş antikorlar yönünden test edildi. Abort yapan grup 90-150, 150-210, 210-260 gün olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Gebeliğin 260. gününden sonra yavru atan inekler ölü doğum grubu olarak kabul edildi. 134 serumun 47'sinde (%35.07) *N. caninum*'a karşı antikorlar tespit edildi. Abort ve ölü doğum gruplarının ortalama prevalansı sırayla %24.44 ve %56.81 olarak belirlendi. Abort grubunun prevalansları ise 90-150 gün için %23.07, 150-210 gün için %18.51 ve 210-260 gün grubu için %29.72 olarak tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Abort, *Neospora caninum*, ölü doğum, prevalans

Introduction

Neospora caninum is a coccidian parasite and an important cause of abortion in cattle worldwide. It was first identified in dogs with encephalomyelitis and myositis in 1984 and was described as a new genus and species in 1988. Domestic dog is definitive host while cattle, sheep, goats, horses, deer are intermediate hosts. Dogs can acquire infection by ingestion of infected tissues; and intermediate hosts can be infected either by horizontal postnatal infection or by vertical transmission during pregnancy. There is no cow to cow transmission (ANDERSON et al., 2000; DUBEY, 2003).

In *Neospora* infection, cows can abort; fetuses may die in utero, be resorbed, mummified, autolyzed, stillborn, born alive with clinical sings or born normally but persistently infected. Moreover, infection may cause premature culling, diminished milk production and repeat breeder prob-

lems in herds (DUBEY, 2006; SIMSEK et al., 2008; THURMOND and HIETALA, 1996, 1997).

Abortion is defined as fetal death and expulsion between 42 and 260 days of gestation. If death occurs at 1-2 month of gestation, it is usually termed as "early embryonic death" whereas a calf that is born death between 260 days and full term is defined as "stillbirth" (HOVINGH, 2009; PETER, 2009). In *Neospora* infection, abortion can occur both in dairy and beef cattle at any stage of pregnancy. However, most abortion occurs during the fourth to sixth month of gestation. Aborted cows can abort again (ANDERSON et al., 2000; DUBEY, 2003). *Neospora caninum* is a major cause of abortion in cattle in many countries. Several studies indicate that 12 to 42% of aborted fetuses from dairy cattle are infected with *N. caninum*. In some dairies up to 87% of cows found as seropositive. Economic loss is estimated in mil-

lions of dollars resulting from abortion, stillbirth, rebreeding, reduced milk production and premature culling (DUBEY, 2003).

In Turkey seroprevalence of *N. caninum* in cows was determined as 13.96% (459/3287) in Central Anatolia (VURAL et al., 2006), 8.02% (22/274) in Thrace (BIYIKOGLU et al., 2003), 9.2% (10/92) in Sakarya (ONCEL and BIYIKOGLU, 2003), 7.5% (23/305) in Sanliurfa (SEVGILI and ALTAS, 2005), 7% (13/186) in Kayseri (ICA et al., 2006) and 7.01% (36/513) in Eastern Anatolia (AKTAS et al., 2005). Seroprevalence of *N. caninum* was found significantly higher in dairy cows with repeat breeder (13.48%, 12/89) than healthy pregnant (3.19%, 3/94) (SIMSEK et al., 2008). In aborted cows, seroprevalence was determined to be 23.61% (34/144) in Central Anatolia (VURAL et al., 2006), 3.12% (1/32) in Eastern Anatolia (AKTAS et al., 2005), and 33.3% (3/9) in Kayseri (ICA et al., 2006).

The aim of this study was to determine the prevalence of *N. caninum* in cows at different stages of gestation.

Material and Method

For this purpose a total of 134 cow sera that sent to Central Veterinary Control and Research Institute, Parasitology Laboratory without age and breed information were collected by farm veterinarians. Sera samples were stored at -20°C until tested. Based on the definition abortion and stillbirth, sera were divided into two groups as abortion and stillbirth. Abortion group was further divided into 90-150, 150-210, 210-260 day groups. Antibodies to *N. caninum* were detected by using a commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA) kit (VMRD, USA). The test was done following the instructions of manufacturer. The mean optical density (OD) at 630 nm was determined for all wells using a microplate reader (ELx 800 UV, Universal Microplate Reader, Bio-Tec Instruments, Inc). The percent inhibition for each test sample was determined using the below mentioned formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \frac{\text{Sample O.D.} \times 100}{\text{Mean negative control O.D.}}$$

The samples with values of $\geq 30\%$ inhibition were regarded as positive and those with the values $< 30\%$ inhibition were regarded as negative.

Findings

The overall prevalence of *N. caninum* was 35.07% (47/134). Mean prevalences of abortion and stillbirth group were 24.44% and 56.81% respectively. In abortion group, prevalences were 23.07% for 90-150 day group, 18.51% for 150-210 day group and 29.72% for 210-260 day group. Results of the study are also summarized in tables (Table 1 and 2).

Table 1. Total prevalence of *N. caninum* in abortion and stillbirth group.

	Abortion	Stillbirth	Total
The number of animal tested	90	44	134
The number of infected animals	22	25	47
Prevalence (%)	24.44	56.81	35.07

Table 2. Prevalence of *N. caninum* in different stages of gestation.

Days	Abortion/ Stillbirth	Infected	Prevalence (%)
90-150	26	6	23.07
150-210	27	5	18.51
210-260	37	11	29.72
> 260	44	25	56.81

Discussion and Conclusion

In this study, the prevalence of *N. caninum* was determined in different stages of gestation and the overall prevalence was found as 35.07%. This result was obviously higher than the prevalence findings of randomly selected cows (AKTAS et al., 2005; ICA et al., 2006; VURAL et al., 2006). Higher prevalences were accumulated in stillbirth (56.81%) and 210-260 day groups (29.72%) while lower prevalences were detected in 150-210 (18.51%) and 90-150 (23.07%) day groups. Although most abortion occurs during the fourth to sixth months (ANDERSON et al., 2000), this study indicated that abortion and stillbirth ratios were

higher after 210 days. Nevertheless, high seroprevalences were observed at every stages of gestation in cows with abortion and stillbirth. Except Eastern Anatolia, results showed that seroprevalences increase in aborted cows (AKTAS et al., 2005; ICA et al., 2006; VURAL et al., 2006).

Seroprevalence data about dog neosporosis are limited in Turkey (COSKUN, 2000; YILDIZ et al., 2007). Coskun et al. (2000), found 10% seropositivity in 150 dogs by indirect fluorescent antibody test (IFAT) in two provinces of Turkey. Yıldız et al. (2007), examined 117 dogs with IFAT in Kırıkale province and reported 26.5% seropositivity. High or low prevalences in aborted cows may be associated with the prevalence ratios of *N. caninum* in dogs.

There are only three studies about aborted cows however there is no seroprevalence data related with abortion and stillbirth dates. These studies are especially focused on the general seroprevalence of the parasite (AKTAS et al., 2005; ICA et al., 2006; VURAL et al., 2006). Our study is the first detailed study about the seroprevalence of *N. caninum* at different stages of gestation in Turkey. We think that further studies are required to determine the prevalence of *N. caninum* in definitive and intermediate hosts for a clear understanding of disease's epidemiology. Additionally, for attaching necessary importance to the disease, economic effects of *N. caninum* should be surveyed in detail.

In conclusion, current study illustrated that *N. caninum* may cause abortion in any stage of pregnancy and has a high prevalence in cows with stillbirth.

References

1. Aktas M, Saki CM, Altay K, Simsek S, Utuk AE, Koroglu E, Dumanlı N (2005). *Survey of Neospora caninum in cattle in some provinces in the Eastern Anatolian Region*. Acta Parasitol Turcica, 29, 22-25.
2. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA (2000). *Neosporosis in Cattle*. Anim Rep Sci. 60-61, 417-431.
3. Bıyıkoglu G, Oncel T, Bağcı O (2003). *Trakya sığırlarında Neospora caninum seroprevalansı*. XIII Ulusal Parazitoloji Kongresi, Konya, Türkiye. 246.
4. Coskun SZ, Aydın L, Bauer C (2000). *Seroprevalence of Neospora caninum infection in domestic dogs in Turkey*. Vet Rec. 146: 649.
5. Dubey JP (2003). *Review of Neospora caninum and neosporosis in animals*. Korean J Parasitol. 41, 1-16.
6. Dubey JP, Schares G (2006). *Diagnosis of bovine neosporosis*. Vet Parasitol. 140, 1-34.
7. Hovingh E (2009). *Abortions in dairy cattle-I: Common causes of abortions*. <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-288/404-288.pdf>
8. İça A, Yıldırım A, Duzlu O, İnci A (2006). *Seroprevalence of Neospora caninum in cattle in the region of Kayseri*. Acta Parasitol Turcica. 30, 92-94.
9. Oncel T, Bıyıkoglu G (2003). *Neosporosis caninum in dairy cattle in Sakarya, Turkey*. Uludağ Univ J Fac Vet Med. 22, 87-89.
10. Peter AT (2009). *Abortions in dairy cows: New insights and economic impact*. <http://www.wcds.afns.ualberta.ca/Proceedings/2000/Chapter19.htm>
11. Sevgili M, Altaş MG (2005). *Seroprevalence of Neospora caninum in cattle in the province of Sanliurfa*. Turk J Vet Anim Sci. 29, 127-130.
12. Simsek S, Utuk AE, Koroglu E, Dumanlı N, Risvanlı A (2008). *Seroprevalence of Neospora caninum in repeat breeder dairy cows in Turkey*. Arch Tierz Dummerstorf. 51,143-148.
13. Thurmond MC, Hietala SK (1996). *Culling associated with Neospora caninum infection in dairy cows*. Am J Vet Res. 57, 1559-1562.
14. Thurmond MC, Hietala SK (1997). *Effect of congenitally acquired Neospora caninum infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle*. Am J Vet Res. 58, 1381-1385.
15. Vural G, Aksoy E, Bozkır M, Kuçukayan U, Erturk A (2006). *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle herds in Central Anatolia, Turkey*. Vet Arhiv. 76: 343-349.
16. Yıldız K, Yagcı BB, Duru SY, Ocal N, Karaca S (2007). *Kırıkale'de köpeklerde Neospora caninum antikorlarının seropozitivitesinin belirlenmesi*. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Türkiye. 147.

Geliş Tarihi / Received: 23.10.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. F. Çiğdem Pişkin

Central Veterinary Control and Research Institute,

Parasitology and Bee Diseases Laboratory,

06020, Etlik, Ankara, Turkey

E-posta: cigdempiskin@hotmail.com

Damızlık tavuk işletmelerinde tespit edilen mikoplazma infeksiyonları

Asiye DAKMAN¹, Elçin GÜNAYDIN¹, Mehmet Ali TÜRKYILMAZ², Metin GÜLEÇ¹,
Mustafa COŞAR¹, Ümit ÖZDEMİR²

¹Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara; ²Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Mikoplazma Teşhis Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Özet: Kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan farklı mikoplazma etkenleri bulunmaktadır. Bu etkenlerden *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) ve *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) en önemli türler olup OIE listesinde yer almaktadır. *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* vertikal bulaşması nedeniyle damızlık sürülerde ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle de vertikal bulaşmanın şekillenmesi ve damızlıkların bu infeksiyonlar yönünden ari olması gerektiği için, bu iki infeksiyon etkeninin hızlı, güvenilir bir testle teşhisi neticesinde acil koruma ve kontrol önlemlerinin alınması şarttır. Bu çalışmada 2009 yılında Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı tarafından denetimi yapılan damızlık işletmelerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve etken izolasyonu ile tespit edilen mikoplazma infeksiyonları ortaya konmuştur. Enstitümüze bağlı illerde bulunan damızlık işletmelerden alınan kan serumu örnekleri *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* yönünden serum pleyt aglutinasyon test (SPAT) ve ELISA ile test edildikten sonra, seroloji ile *M. synoviae* pozitif bulunan damızlık işletmelerden alınan trakeal svap örnekleri PZR ve etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılarak incelenmiştir. Damızlık işletmelerin tamamı *M. gallisepticum* yönünden negatif bulunmuştur. İşletmelerin %8.5'i SPAT, ELISA ve PZR ile *M. synoviae* pozitif bulunurken ancak %2.5'inden etken izolasyonu yapılabilmektedir. PZR ve etken izolasyonu karşılaştırıldığında ise; PZR ile pozitif bulunan işletmelerin sadece %33.4'ünde etken izolasyonu yapılabilmektedir. *M. gallisepticum* ve *M. synoviae*'nin teşhisinde PZR tamamen konvansiyonel kültürel yöntemlerin yerini alamamasına rağmen, bakteriyoloji ile desteklendiğinde erken ve kesin teşhis açısından damızlık sürülerde başta olmak üzere kanatlı endüstrisine faydalı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Bakteriyoloji, damızlık sürü, ELISA, *Mycoplasma synoviae*, PZR, SPAT

Mycoplasma infections detected in breeder holdings

Summary: Various *Mycoplasma* species which causes illness at poultry exist. Of the all *Mycoplasma* spp. *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) and *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) are the most important species and take place in the OIE list. Due to vertical transmission of *M. gallisepticum* and *M. synoviae*, they do have an importance at breeder flocks. Urgent protection and control measurements have to be applied according to the results of the diagnosis of rapid and reliable test due to the vertical transmission and *Mycoplasma*-free required breeder flocks. In this study, *Mycoplasma* infections diagnosed by polymerase chain reaction (PCR) and agent isolation at the breeder flocks which are controlled by Poultry Diagnosis Laboratory of Central Veterinary Control and Research Institute were introduced. After the serum samples which had been taken from the breeder flocks in the provinces under the responsibility of our institute were tested for *M. gallisepticum* and *M. synoviae* by SPAT, ELISA, tracheal swap samples taken from *M. synoviae* positive breeder flocks were examined by PCR, agent isolation and identification. All the breeder flocks were found to be *M. gallisepticum* negative by SPAT and ELISA. Of the holdings, while 8.5% were found to be *M. synoviae* positive by SPAT, ELISA and PCR, agent identification was achieved from 2.5%. Comparison of PCR and bacteriology, agent isolation was done 33.4% solely from the holdings which are found to be *M. synoviae* positive by PCR. Although PCR can not replace the conventional cultural methods totally for the diagnosis of *Mycoplasma* spp. it will be useful for poultry industry, especially, poultry breeders, if it is supported by conventional cultural methods in order to rapid and definite diagnosis of *Mycoplasma* spp.

Keywords: Bacteriology, breeder flock, ELISA, *Mycoplasma synoviae*, PCR, SPAT

Giriş

Kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan farklı mikoplazma etkenleri bulunmaktadır. Bu etkenlerden *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ve *Mycoplasma synoviae* (MS) en önemli türler olup OIE listesinde yer almaktadır (ANON., 2008). *M. gallisepticum* yaygın olarak tavuklarda kronik solunum yolu hastalığına (CRD) sebep olur. CRD, nazal akıntı, solunum güçlüğü, konjunktivitis, et-tipi kanatlılarda karkas ağırlığının düşmesi, yumurtacı kanatlılarda yumurta veriminin azalmasına neden olan bulaşıcı bir hastalıktır (ANON., 2008; LEY, 2003). *M. synoviae* infeksiyonları genellikle subklinik üst solunum yolu infeksiyonları şeklinde gözükür. *M. synoviae* tavuklarda sinoviyal membranların yangılanması ile karakterize eklem lezyonları, topallık ve bunları takip eden süreçte büyümede gecikme ile ilişkilendirilmiştir (KLEVEN, 2003). *M. synoviae* ve *M. gallisepticum* infeksiyonlarında diğer viral ve bakteriyel etkenlerle komplike olan vakalarda ekonomik kayıplar ve ölüm oranı ciddi düzeyde artar (ANON., 2008; KLEVEN, 2003).

M. gallisepticum ve *M. synoviae* vertikal bulaşması nedeniyle damızlık sürülerde ayrı bir öneme sahiptir (ANON., 2008). Hastalıkta en önemli kayıp mikoplazma ile enfekte damızlıklardan elde edilen civcivlerde performans kaybıdır (AKAN ve ark., 2008). Özellikle de vertikal bulaşmanın şekillenmesi ve damızlıkların bu infeksiyonlar yönünden ari olması gerektiği için bu iki infeksiyon etkeninin hızlı, güvenilir bir testle teşhisi neticesinde acil koruma ve kontrol önlemlerinin alınması şarttır (ESENDAL, 2002).

Türkiye’de tavuklarda mikoplazma yaygınlığı ile ilgili çalışmalar sınırlı düzeydedir. Akan ve ark. (2008), yapmış oldukları serolojik ve moleküler incelemede 43 broyler damızlık işletmesinin % 16.3’ünü MG pozitif, %20.9 MS pozitif olarak saptamışlardır. Bunun dışında hastalığı direkt ve indirekt yöntemlerle varlığını saptayan çalışmalar da bulunmaktadır (ÇARLI ve EYİGÖR, 2003).

Mikoplazmaların kontrolünde dünyaca önerilen sistemlerde ortak hedef *grand parent stock*’larda eradike edip, *parent stock* seviyesinde ise iyi bir biyogüvenlik sistemi ile hastalıktan ari yapıyı korumaya çalışmaktır (ANON., 1990; ANON., 1996; GÖKÇELİK, 2008).

Ülkemizde aynı amaçla 1989 yılından beri “Kuluçkahane ve Damızlık İşletmelerinin Sağlık ve Kontrol Yönetmeliği” yürürlüğe girmiş son olarak 2007 yılında yönetmelik güncellenmiştir (ANON., 2007a; ANON., 2007b). Bu yönetmelik kapsamında damızlık sürülerin kontrolleri 16 haftalıktan itibaren başlar ve en az yılda iki kez kontrolleri devam eder. Mikoplazma yönünden yapılan kontrollerde çabuk lam aglutinasyon, serum plak dilüsyon, tüp aglutinasyon testi gibi tarama testleri ile taranır pozitif bulunan sürülerde sonuç nispeten spesifitesi daha yüksek ELISA ve Hemaglutinasyon inhibisyon (HI) gibi ikinci bir serolojik testle doğrulanır. Mikoplazma antikorları yönünden pozitif bulunan sürülerde pozitif ya da şüpheli bulguların kültür ve/veya PZR ile doğrulanması gerekir.

Mikoplazmaların oldukça zor üreyen mikroorganizmalar olmaları ve pasajlarla birlikte yaklaşık 3-4 hafta gibi uzun bir inkubasyon süresine ihtiyaç duymaları, kanatlı sürülerinde geçirilen diğer infeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma etkenlerinin üremesini baskılaması gibi olumsuzluklar, teşhis konulduğunda sürünün sağaltımını ve etkili koruyucu önlemlerin alınmasını engellenmektedir (FREY ve ark., 1968; ESENDAL, 2002).

Kanatlılarda mikoplazma infeksiyonlarının teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), konvansiyonel bakteriyolojik ve serolojik testlerdeki olumsuzlukları aşabilen, spesifite ve sensitivitesi yüksek, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (AKAN ve ark., 2008; ÇARLI ve EYİGÖR, 2003; MAROIS ve ark., 2005).

M. gallisepticum ve *M. synoviae*’nın teşhisi için çok sayıda konvansiyonel PZR (GARCIA ve ark., 1995; KLEVEN, 1997; MAROIS ve ark., 2005) ve *real-time* PZR tekniği (ÇARLI ve ark., 2003; MEKKES ve ark., 2005) kullanılmakta ve bu çalışmalarda adı geçen mikroorganizmaların teşhisi için 16S rRNA genini (KEMPF, 1998; GARCIA ve ark., 2005); yüzey yapışma proteinlerini (*pvpA*, *gapA*, *mgc-2*, *LP*, *msp1*) (GARCIA ve ark., 2005; MAROIS ve ark., 2005) kodlayan genleri ve hemaglutinin proteinlerini kodlayan (*pMGA*, *vlhA*) (NOORMOHAMMADI ve ark., 2000; BEN ABDELMOUMEN ve ark., 2005) genleri çoğaltan çok sayıda primer çifti kullanılmıştır.

Bu çalışmada 2009 yılında Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı tarafından denetimi yapılan damızlık işletmelerinde, *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* infeksiyonları serolojik, bakteriyolojik ve moleküler tekniklerle araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Standart suşlar: Standart *M. gallisepticum* S6 ve *M. synoviae* WU1853 suşları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Mikoplazma Referans Teşhis Laboratuvarından temin edildi.

Test edilen örnekler: Damızlık işletmelerden 5000 kapasiteye kadar %5, bunun üzerindeki her kümeden 300 kan serum örneği alınmış ve SPAT ile MG ve MS yönünden test edilmiştir. MG ya da MS pozitif bulunan her kümeden 23'er adet serum ELISA ile test edilmiştir. ELISA ile pozitiflik saptanan kümeslerden 30'ar adet trakeal svap örneği alınarak PZR yapılmış ve etken izolasyonuna gidilmiştir.

2009 yılında laboratuvarımızın rutin olarak her altı ayda bir denetimlerini yaptığı Eskişehir, Bolu, Ankara, Kayseri ve Kırıkkale illerindeki 37 damızlık işletmeden toplam 134760 adet serum örneği (Tablo 1) ve serolojik testlerle *Mycoplasma* spp yönünden pozitiflik saptanan 3 işletmeden de 270 adet trakeal svap örneği bakteriyolojik kültür ve PZR ile test edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Örnek alınan il, işletme ve toplam serum sayısı.

Yılı	Örnek alınan il sayısı	Örnek alınan işletme sayısı	Toplam serum sayısı
2009	5	37	134760

Tablo 2. Serolojik olarak *Mycoplasma* spp. pozitif işletmelerden alınan örnekler.

İşletme No	Kan serumu	Svap örneği
0601	1200	120
3801	1200	120
3802	300	30
Toplam	2700	270

Trakeal svap örnekleri Frey's medium içine alınarak 24 saat içerisinde soğuk zincirle laboratuvara ulaştırılmış ve bunu takiben, örneklerden 5'erli havuzlar yapılarak, her 5 örnek, vorteksleme işleminden sonra svaplar tüplerin çeperlerine rotasyon hareketleriyle emdikleri trakeal eksudatı bırakacak şekilde gezdirilip atılmıştır. Toplanan eksudatın bir kısmı konvansiyonel kültürel yöntemle bakteriyolojik izolasyon bir kısmı da DNA ekstraksiyonu amacıyla kullanılmıştır.

PZR pozitif bulunan kümeslerden alınan trakeal svap örnekleri aynı zamanda ulusal mikoplazma referans teşhis laboratuvarına da gönderilerek etken izolasyonu çalışması ve tiplendirilmesi sağlandı.

Damızlık tavuk işletmelerinin *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* infeksiyonları yönünden kontrolü 20.03.2007 tarih ve 26468 sayılı Kuluçkahane ve Damızlık İşletmeleri Yönetmeliği ile 30.10.2007 tarih ve 43 sayılı Kuluçkahane ve Damızlık İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı'na göre gerçekleştirildi.

Serum pleyt aglutinasyon testi (SPAT): OIE'de (ANON., 2008) bildirildiği şekilde, *M. gallisepticum* ve *M. synoviae* SPAT antijeni (Pendik) kullanılarak yapıldı.

ELISA: *M. synoviae* için geliştirilmiş ticari bir kit kullanılarak (Idexx; 06728-GE652) firmanın önerdiği prosedüre göre yapıldı.

Etken izolasyon ve identifikasyonu: Frey's broth ve Frey's agar kullanılarak OIE manüelde tanımlanan mikoplazma izolasyon prosedürüne göre gerçekleştirildi (FREY, 1968; ANON., 2008). İzole edilen mikoplazma kültürleri, ulusal mikoplazma referans teşhis laboratuvarına gönderilerek isimlendirildi.

PZR: Marois ve ark. (2005), bildirdikleri yöntem modifiye edilerek yapıldı. Trakeal svap örneklerinden ticari bir kit kullanılarak (Roche; High Pure PCR Template Preparation Kit, 11796828001) DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'dan 2 µl kullanıldı. PZR aşaması PZR kiti (Fermentas, E402) kullanılarak yapıldı. *M. synoviae* PZR'da reaksiyon hacimleri şu şekildedir: 2.5 µl 10×PCR buffer (MgCl₂), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl dNTP (10 mM), 1'er µl MS-Primer F (20 pmol/µl) ve MS-Primer R (20 pmol/µl), 0.5 µl Taq DNA Polymerase, 13.5 µl deiyonize su (PCR grade), 2

ül templeyt olmak üzere total reaksiyon hacmi 25 µl'dir. *Thermal cycler*'da uygulanan ısı döngüleri: 95°C'de 2 dk ön denaturasyon, 35 siklus; 94°C'de 30 sn denaturasyon, 55°C'de 30 sn hibridizasyon, 72°C'de 30 sn ekstensiyon ve 72°C'de 10 dk final ekstensiyon şeklindedir. Reaksiyon sonunda %1.5'lük agaroz jelde (Seakem LE agarose, 50004L), 1000 V'da 30 dk sürüyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı ve oluşan bantlar UV transilluminatör (Ultra-violet products/UVP) ve jel dokümantasyon sistemi (Biotech Image Master-VDS+Fujifilm Termal Imagine System FTI-500) yardımı ile görüntülendi. Oluşan PZR ürünlerinin büyüklüğü yaklaşık 400 bp olarak belirlendi.

Primerler: Çalışmada kullanılan *M. synoviae* primerlerinin baz dizilimi şu şekildedir:

Ms-pcl5: 5'-TCA TTC AGC GCC AGC TGG TTC-3' ve Ms-pcl4: 5'-GCT TGA GTC TCC ATT AAC TTG TTG TTC-3'.

Bulgular

Çalışmada 2009 yılında kontrolleri yapılan 37 damızlık işletmesinin 3 (%8.1)'ünde *M. synoviae* pozitif bulunmuştur (Tablo 3). Bu işletmelerden 1'i Ankara, 2'si Kayseri ilinde bulunan damızlık işletmelerdir. MS pozitif bulunan kümeslerden alınan kan serumu ve trakeal svap örneklerinin SPAT, ELISA, PZR ve bakteriyel kültür yöntemi ile etken izolasyonu sonuçları sırasıyla Tablo 4, 5 ve 6'da yer almaktadır.

Çalışmada bütün işletmelerden alınan serumlar *M. gallisepticum* yönünden de test edilmiş ancak negatif bulunmaları nedeniyle sonuçlar ayrıntılı

lı verilmemiştir. Ayrıca bakteriyolojik kültür yöntemleri ile hem *M. gallisepticum* hem de *M. synoviae* yönünden ekimler yapılmış sadece 1 (%2.5) işletmenin 2 kümesinden *M. synoviae* izolasyonu gerçekleşmiştir.

Tablo 3. *Mycoplasma* spp. pozitif işletmelerin illere göre dağılımı.

Damızlık işletmelerin bulunduğu iller	<i>Mycoplasma</i> spp. yönünden kontrol sonuçları	
	Pozitif işletme sayısı	Negatif işletme sayısı
Ankara	1	12
Bolu	-	12
Eskişehir	-	7
Kayseri	2	-
Kırıkkale	-	1

Ankara'daki 1 damızlık işletmesine (İşletme kodu: 0601) ait 4 kümeden alınan toplam 1200 serum örneğinin %81'i SPAT ile, her kümeden 23'er adet olmak üzere toplam 92 adet serumun %88'i ELISA ile *M. synoviae* yönünden pozitif sonuç alınmıştır. Her kümeden 30'ar olmak üzere toplam 120 trakeal svap örneğinden 114'ü (%95) PZR ile pozitif bulunmuştur. Etken izolasyonu çalışmasında ise sadece 4 no'lu kümeden alınan 30 (%25) örnekten *Mycoplasma* spp. izole edilmiş ve ulusal mikoplazma referans teşhis laboratuvarında *M. synoviae* olarak isimlendirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. 0601 no'lu damızlık işletmesinden alınan serum ve trakeal svap örneklerinin test sonuçları.

Ankara 0601 no'lu damızlık işletmesi	SPAT		ELISA		PZR		Etken izolasyonu	
	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
	+	-	+	-	+	-	+	-
1. kümes	210	90	15	8	24	6	-	30
2. kümes	267	33	23	-	30	-	-	30
3. kümes	255	45	23	-	30	-	-	30
4. kümes	240	60	20	3	30	-	30	-
Toplam %	972 %81	228 %19	81 %88	11 %12	114 %95	6 %5	30 %25	90 %75

Kayseri'de bulunan 3801 no'lu damızlık işletmesine ait 4 kümeden toplam 1200 adet serum örneği alınmış ve bunların tamamı MS yönünden SPAT ile pozitif bulunmuştur. MS yönünden yapılan ELISA testi ile kümeslerin tamamı ve test edilen örneklerin %97.8'i pozitif bulunmuştur. Trakeal örneklerden yapılan PZR da kümeslerin tamamı ve alınan örneklerin %87.5'inin MS yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Ancak aynı trakeal örneklerden yapılan bakteriyolojik kültür yöntemi ile örneklerin hiçbirinden mikoplazma izolasyonu yapılamamıştır (Tablo 5). Kayseri'de bulunan diğer damızlık işletmesinde (3802 no'lu işletme) ise tek bir kümede bulunan damızlık tavuklardan alınan 300 kan serum örneğinin tamamı SPAT ile MS pozitif bulunmuş bunlardan 23'üne ELISA yapılarak yine tamamının MS pozitif olduğu belirlenmiştir. Alınan 30 trakeal örneğin tamamı PZR ile pozitif bulunurken, bu trakeal örneklerin hiçbirinden *Mycoplasma* spp. izole edilememiştir (Tablo 6).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada SPAT ile *Mycoplasma* spp. yönünden kontrolleri yapılan 37 işletmenin 3'ü (%8.5) *M. synoviae* yönünden pozitif bulunmuştur. 0601 no'lu işletmede test edilen serumların %81'i, 3801 ve 3802 no'lu işletmelerde ise tamamı pozitif bulunmuştur. SPA testi çabuk ucuz ve duyarlılığı (sensitivite) yüksek olması sebebiyle sürü izleme programlarında bir tarama testi olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (ANON.,1996; KLEVEN ve LEVISOHN, 1996; KLEVEN, 1998). Bununla birlikte hemolizli ve kontamine serumlar, yakın zamanda diğer hastalıklar için inaktif aşı uygulamaları nonspesifik reaksiyonlara sebep olabilir (CULLEN ve TIMMS, 1972; GLISSON ve ark., 1984; YODER, 1989). Ayrıca Robert ve Olesuik (1967), doku reaksiyonunun situmule ettiği rematoid faktörün bulunmasının *M. synovia* ile kros reaksiyona sebep olduğunu bildirmişlerdir. SPA ile test edilen kan serumlarında yüksek pozitiflik nonspesifik reaksiyonlara bağlı olabilir. Ancak aynı serum örneklerinin *M. gallisepticum* yönünden negatif bulunması yanlış pozitiflik ihtimalinin düşük olduğunu göstermektedir.

Tablo 5. 3801 no'lu damızlık işletmesinden alınan serum ve trakeal svap örneklerinin test sonuçları.

Kayseri 3801 no'lu damızlık işletmesi	SPAT		ELISA		PZR		Etken izolasyonu	
	+	-	+	-	+	-	+	-
1. kümes	300	-	23	-	30	-	-	30
2. kümes	300	-	22	1	15	15	-	30
3. kümes	300	-	23	-	30	-	-	30
4. kümes	300	-	22	1	30	-	-	30
Toplam %	1200 %100	-	90 %97.8	2 %2.2	105 %87.5	15 %12.5	-	120 %100

Tablo 6. 3802 no'lu damızlık işletmesinden alınan serum ve trakeal svap örneklerinin test sonuçları.

Kayseri 3802 no'lu damızlık işletmesi	SPAT		ELISA		PZR		Etken izolasyonu	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Tek kümes	300	-	23	-	30	-	-	30

Çalışmada 0601 no'lu işletmeden alınan serum örneklerinin %81'i SPAT ile MS pozitif bulunmuştur. SPA ile pozitif bulunan serumların 92'si ELISA yapılmış ve %88'inin pozitif olduğu tespit edilmiştir. 3801 no'lu işletmede SPAT ile pozitif bulunan 92 serum örneğinin %97.8'i ve 3802 no'lu işletmede ise SPA ile MS pozitif 23 serumun tamamı ELISA ile de pozitif bulunmuştur. Ewing ve ark. (1996), yapmış oldukları bir çalışmada 71 adet ticari tavuk kümesinden 3'ünü (%4.2) seropozitif olarak tanımlamış, bu sürülerden alınan serum örneklerinin %74'ü SPA ile pozitif bulunmuştur. SPA ile pozitif bulunan serum örneklerinin %98.6'sı ELISA ile de pozitif sonuç vermiştir. Çalışmada enfeksiyonun erken safhasında SPA ve HI testlerinin başarısız olduğu ancak ELISA ve PZR ile yeni başlamış enfeksiyonları yakalayabildiklerini bildirmişler ELISA'yı tarama testi PZR'yi konfirmasyon testi olarak kullanılmasını önermişlerdir. Bu çalışmada kontrolü yapılan damızlık sürülerinde enfeksiyonun hangi safhasında olduğu bilinmemektedir.

Bu çalışmada sonuçlarla örtüşür şekilde; Marois ve ark. (2000) deneysel ve doğal infekte kanatlıların yem, içme suyu, tüy ve kümes tozlarından aldıkları svap örneklerinden bakteriyoloji ve PZR ile yaptıkları *M. synoviae* taramasında; inceledikleri 96 adet deneysel infekte kanatlılarda bakteriyoloji ile 10/96, PZR ile 46/96 *M. synoviae* pozitiflik tespit ederken, doğal infekte kanatlılarda bakteriyoloji ve PZR ile sırasıyla, 7/28 ve 17/28 oranında *M. synoviae* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Heidelberg ve ark. (1997) bakteriyoloji ile düşük pozitifitenin tespit edilmesini *Mycoplasma* spp.'nin nazlı üreyen mikroorganizma olmasına veya svap örneklerinde canlı fakat kültürleri yapamayan bir durumda bulunmalarına dayandırmışlardır. Ayrıca kanatlı sürülerinde geçirilen diğer enfeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklerin mikoplazma etkenlerinin üremesini baskılaması, etken izolasyonunu engelleyen faktörlerden biridir (FREY ve ark., 1968). Ankara ilindeki 1 adet işletmenin toplam 4 adet kümesinin sadece birinde bakteriyoloji ile pozitiflik tespit edilirken, Kayseri ilindeki her iki damızlık işletmede kültür ile pozitiflik tespit edilememiştir. Buna karşın seroloji ile pozitiflik tespit edilen 3 damızlık işletmenin tamamı PZR ile *M. synoviae* pozitif bulunmuştur.

PZR ile *M. synoviae* teşhisi 1-2 gün içinde tamamlanırken, etken izolasyonu 3-4 haftalık bir zaman dilimini gerektirmektedir.

Sonuç olarak, PZR mikoplazmaların rutin teşhisinde, SPAT, ELISA gibi primer tanı testlerinin konfirmasyonunda bakteriyoloji ile birlikte yürütüldüğü takdirde, hızlı ve güvenilir bir test metodu olarak acil koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasına fayda sağladığı ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. **Akan M, İzgür M, Sareyyüpoğlu B, Çiftçi A, İça T,** (2008). *Tavuklarda Solunum Sistemi Hastalıklarının Epidemiyolojisi*. Ankara Üniv. BAP Projesi-Ankara.
2. **Anonim,** (2008). Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*) Chapter 2.3.5 in OIE Terrestrial Manual Online. p. 482 - 496. Erişim: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.05_20AVIAN_MYCO.pdf]. Erişim Tarihi: 30.10.2009.
3. **Anonim,** (2007a). Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği. 20.03.2007 Tarih ve 26468 sayılı Resmi Gazete.
4. **Anonim,** (2007b). Kuluçkahane ve Damızlık Kanatlı İşletmeleri Yönetmeliği Uygulama Talimatı. 30.11.2007 Tarih ve 43 Numaralı Talimat.
5. **Anonim,** (1996). National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. APHIS 91-55-031. USDA, Washington, DC.
6. **Anonim,** (1990). Council Directive on animal health conditions governing intra-Community trade in, and imports from third countries of, poultry and hatching eggs. Council Directive (90/539/EEC).
7. **Mardassi BBA, Mohammed RB, Gueriri I, Boughattas S, Mlik B,** (2005). Duplex PCR to Differentiate Between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the Basis of Conserved Species-Specific Sequences of Their Hemagglutinin Genes. J Clin Microbiol. 43 (2), 948-958.
8. **Carli KT, Eyigor A,** (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. Avian Dis. 47, 712-717.
9. **Cullen GA, Timms LM,** (1972). Diagnosis of mycoplasma infection in poultry previously vaccinated with killed adjuvant vaccines. Br Vet J. 128, 94-100.
10. **Esendal ÖM,** (2002). Mikoplazma enfeksiyonları, 79-92, In: Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., İzgür, M., Yardımcı, H., Esendal, Ö.M., Erdeğer, J. ve Akan, M., Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayınları, No, 26, Ankara.
11. **Ewing ML, Laurmen LH, Kleven SH, Brown MB,** (1996). Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. Avian Dis. 40 (4), 798-806.
12. **Frey M L, Hanson RP, Anderson DP,** (1968). A Medium for the isolation of Avian Mycoplasmas. Am J Vet Res. 29, 2163-2171.

13. **Garcia M, Ikuto N, Levisohn SS, Kleven S.H,** (2005). *Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of Mycoplasma gallisepticum Infection in Chickens*. Avian Dis. 49, 125-132.
14. **Garcia M, Jackwood MW, Levisohn S, Kleven SH,** (1995). *Detection of Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, and M. iowae by Multi-Species Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism*. Avian Dis. 39, 606-616.
15. **Glisson JR, Dawe JF, Kleven SH,** (1984). *The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae*. Avian Dis. 28, 397-405.
16. **Gökçelik G,** (2008). *Mikoplazma infeksiyonlarının teşhisi ve serolojik izleme programlarının önemi*. Veteriner Tavukçuluk. Derneği Mektup Ankara 6 (1), 6-11.
17. **Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, Rahman I, Stema G, Grim C, Colwell RR,** (1997). *Effect of aerolization on culturabişklity and viability of gram-negative bacteria*. Appl Environ Microbiol. 63, 3585-3588.
18. **Kempf I,** (1998). *DNA Amplification Methods for Diagnosis and Epidemiological Investigations of Avian Mycoplasmosis*. Avian Pathol. 27, 7-14.
19. **Kleven SH,** (2003). *Mycoplasma synoviae infection*. In: Diseases of Poultry, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 756-766.
20. **Kleven SH,** (1998). *Mycoplasmosis*. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed (eds.). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, Fourth ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA, 74-80.
21. **Kleven SH,** (1997). *Changing expectations in the control of Mycoplasma gallisepticum*. Acta Vet Hung. 45, 299-305.
22. **Kleven SH, Levisohn S,** (1996). *Mycoplasma infections of poultry*. In J. G. Tully (ed.). Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Volume II-Diagnostic Procedures, Vol. II. Academic Press, Inc.: New York, 283-292.
23. **Ley DH,** (2003). *Mycoplasma gallisepticum infection*. In: Diseases of Poultry, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 722-744.
24. **Marois C, Picault JP, Kobisch M, Kempf I,** (2005). *Experimental Evidence of Indirect Transmission of Mycoplasma synoviae*. Vet Res. 36, 759-769.
25. **Mekkes DR, Feberwee A,** (2005). *Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Qualitative and Quantitative Detection of Mycoplasma gallisepticum*. Avian Pathol. 34 (4), 348-354.
26. **Noormohammadi AH, Markham PF, Kanci A, Whithear KG, Browning GF,** (2000). *A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of mycoplasma synoviae*. Mol Microbiol. 35 (4), 911-23.
27. **Roberts DH, Olesiuk OM,** (1967). *Serological studies with Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 11, 104-119.
28. **Yoder HW,** (1989). *Nonspecific reactions to Mycoplasma serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines*. Avian Dis. 33, 60-8.

Geliş Tarihi / Received: 02.11.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 13.11.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. Asiye Dakman

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı,

06020, Etlik, Ankara, Türkiye

E-posta: asiyedakman@hotmail.com

Atık fetus mide içeriklerinden konvansiyonel kültürel yöntem ve polimeraz zincir reaksiyonu ile *Brucella* spp.'nin teşhisi

H. Kaan MÜŞTAK¹, Elçin GÜNAYDIN², Uğur KÜÇÜKAYAN¹, Asiye DAKMAN²

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ¹Yetiştirme Hastahkları Laboratuvarı; ²Kanatlı Hastahkları Araştırma ve Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Özet: Brusellosis, *Brucella* türlerinin neden olduğu oldukça bulaşıcı, zoonotik bir enfeksiyondur. Brusellozisin teşhisinde, serolojik ve konvansiyonel kültürel yöntemlerin yanı sıra farklı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları da kullanılmaktadır. Bu çalışmada 31 adet sığır, 8 adet koyun ve 1 adet keçi fetal atık mide içeriğinden bakteriyolojik kültür ve PZR ile *Brucella* spp.'nin belirlenmesi ve her iki teşhis yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda her iki yöntemle de benzer pozitif ve negatif sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Brucella* spp., fetus, konvansiyonel kültürel yöntem, mide içeriği, PZR

Diagnosis of *Brucella* spp. by conventional cultural method and polymerase chain reaction in stomach contents of aborted fetuses

Summary: Brucellosis is a contagious, zoonotic infection caused by *Brucella* species. Beside the serological and conventional cultural methods, different polymerase chain reaction (PCR) applications can be used in diagnosis of brucellosis. The aim of this study was to compare bacteriological culture and PCR methods used for the detection of *Brucella* spp. in stomach contents of the 31 bovine, 8 ovine and 1 caprine aborted fetuses. At the end of the study, same positive and negative results were obtained from both methods.

Keywords: *Brucella* spp., conventional cultural method, fetus, PCR, stomach content

Brusellozis dünyada ve ülkemizde çiftlik hayvanları açısından ekonomik önem arz eden, insan sağlığı açısından da tehdit unsuru oluşturan, oldukça yaygın zoonotik bir enfeksiyondur (AYDIN ve PARACIKOĞLU, 2006). Bu nedenle, enfeksiyonun hızlı ve güvenilir bir şekilde teşhisinin yapılabilmesi, ülke hayvancılığı ve insan sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Sığır ve koyunlarda brusellozis, *Brucella* genusu içerisinde bulunan, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* gibi farklı *Brucella* türleri tarafından oluşturulur. Brusellozisin rutin teşhisinde, serolojik ve bakteriyolojik testler gibi konvansiyonel yöntemlerden (HESTERBERG ve ark., 2008) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler tekniklerden faydalanılmaktadır (HINIĆ ve ark., 2009).

Konvansiyonel yöntemlerden bakteriyolojik kültür ile brusellozisin teşhisi her zaman mümkün olmamaktadır. Bunun nedenleri; *Brucella*'nın zor üreyen bir bakteri olması, izolasyon için zenginleş-

tirilmiş besi yerleri ve özel inkubasyon koşullarına gereksinim göstermesi, identifikasyon sürecinin uzun zaman alması, marazi maddelerin zamanında ve uygun şartlarda laboratuvara ulaştırılmaması olarak sıralanabilir. Serolojik metotlar ise, numune (kan serumu, süt serumu vb.) alımının kolaylığı, rahat uygulanabilirliği, kısa sürede sonuç alınabilmesi, sensitivitesinin yüksek olması nedeniyle brusellozisin teşhisinde daha çok kullanılmaktadır. Ancak sürü içerisindeki tüm hayvanlar teşhis edilebilir düzeyde antikor yanıtı oluşturmamakta, aşı ve doğal enfekte hayvanların ayrımı yapılamamakta ve mikroorganizmanın diğer bakterilerle çapraz reaksiyon vermesi yanlış pozitif sonuçların alınmasıyla neticelenebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı enfeksiyonun serolojik teşhisinde en az iki testin birlikte uygulaması gerekmektedir (ALTON ve ark., 1988).

1987'den beri *Brucella* spp.'nin teşhisi için çok sayıda farklı primer çifti kullanılmış ve sayısız PZR tekniği geliştirilmiştir. *Brucella* spp.'nin teş-

hisinde kullanılan ilk PZR tabanlı testlerde cins-spesifik bölgenin identifikasyonu amaçlanmıştır (FEKETE ve ark., 1990). Bu amaçla, IS711 olarak tanımlanan insersiyon sekansı (BRICKER ve HALLING, 1994), 16S rRNA geni (HERMAN ve DE RIDDER, 1992), 16S-23S rRNA operonu (ROMERO ve ark., 1995), 31 kDA dış membran proteini (MAYFIELD ve ark., 1988), 43 kDA dış membran proteini (FEKETE ve ark., 1990), omp-2 dış membran proteini (LEAL-KLEVEZAS ve ark., 1995) PZR çalışmalarında kullanılmıştır. Daha sonraları, *Brucella* türlerinin ve/veya biyovarylarının ayrımı için çeşitli PZR teknikleri geliştirilmiştir (ADONE ve ark., 2001). Konvansiyonel PZR teknikleri dışında son yıllarda gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) kullanımı da laboratuvarlarda yerini almaktadır (HINIĆ ve ark., 2009). PZR ile *Brucella* spp.'nin teşhisi ilk zamanlar izolatlardan elde edilen purifiye DNA'lerden gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda fetal atıklar ve maternal dokular (ÇETİNKAYA ve ark., 1999), kan (GUARINO ve ark., 2000), süt (ROMERO ve LOPEZ-GONI, 1999), nazal sekret (SREEVATSAN ve ark., 2000), semenden (AMIN ve ark., 2001) elde edilen DNA'larla da PZR uygulamaları yapılmıştır.

Bu çalışmada, brusellozis şüphesiyle, 2008-2009 yılları arasında, soğuk zincirde Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarına gönderilen 31 adet sığır, 8 adet koyun ve 1 adet keçi fetal atığına ait mide içeriğinden kültür ve *Brucella abortus*'un 16S rRNA sekansından elde edilen cins-spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR (ROMERO ve ark., 1995) ile *Brucella* spp.'nin teşhisi gerçekleştirildi.

Brucella türlerinin izolasyonları için atık fetüslere ait mide içeriklerinin izolasyon çalışması, Serum-Dekstroz agarda gerçekleştirildi. Daha sonra agar pleytler, %10 CO₂'li etüvde, 37°C'de, 4-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra şüpheli koloniler, koloni morfolojisi, Gram boyama, oksidaz, katalaz, üreaz ve nitrat redüksiyon gibi biyokimyasal özellikler dikkate alınarak *Brucella* spp. yönünden incelendi (ALTON ve ark., 1988).

Bakteriyoloji ve PZR'de pozitif kontrol olarak atık fetus mide içeriklerinden izole edilen ve Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde tiplendirilen *B. abortus* ve *B. melitensis* suşları kullanıldı.

Ekstraksiyon öncesi fetal atıkların mide içerikleri 1 saat boyunca 65°C'de inaktive edildi. İnaktivasyon sonrası ticari bir DNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın önerdiği şekilde (Qiagen Blood Tissue Kit, Qiagen; 69506) ekstraksiyon gerçekleştirildi.

Daha önce Romero ve ark. (1995) tarafından kullanılan *Brucella abortus* 16S rRNA sekansından elde edilen cins-spesifik F4, R2 primerleri kullanıldı (Tablo 1).

PZR için Romero ve ark. (1995)'nin bildirdikleri yöntem modifiye edilerek uygulandı. PZR reaksiyonu Fermentas Taq DNA Polymerase (rekombinant) Kit (Ürün No: EP0402) ile gerçekleştirildi. PZR'de kullanılan reaksiyon hacimleri şu şekildedir: 2.5 µl PCR buffer (MgCl₂ ihtiva etmemektedir), 0.5 µl dNTP (10 mM), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), her primerden 1 µl (20 pmol/µl), 2 µl templeyt, 16 µl deiyonize su olmak üzere toplam reaksiyon hacmi 25 µl'dir. PZR reaksiyonu parametreleri sırasıyla şu şekildedir: 95°C'de 2 dk ön denaturasyonu takiben 35 siklus boyunca 95°C'de 30 sn denaturasyon, 55°C'de hibridizasyon, 72°C'de 30 sn ekstensiyon ve ardından 72°C'de 10 dk final ekstensiyon.

10 µl PZR ürünü, ethidium bromide ile boyanan %1.5'lük agaroz jelde (Seakem; Seakem LE agarose, 50004L) 30 dk boyunca 100 V'da yürütüldü. DNA bantları UV transluminatör (Ultraviolet Products/UVP) ve jel dökümantasyon sistemi (Bitech Image Master-VDS Fujilim Termal Imagine System FTI-500) yardımı ile görüntülendi. Oluşan PZR ürünlerinin büyüklüğü yaklaşık 905 bp olarak belirlendi.

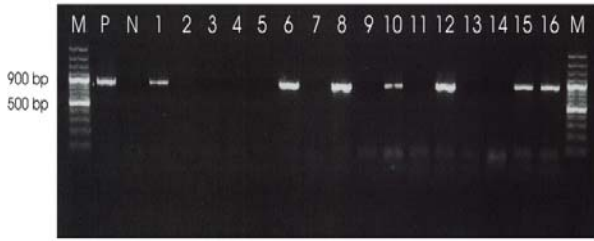
Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler.

Primer	Sekanslar (5'-3')	Lokalizasyon
F4	TCG AGC GCC CGC AAG GGG	63-79
R2	AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA	947-966

Tablo 2. PZR ve konvansiyonel kültür yöntemi ile elde edilen sonuçların hayvan türlerine göre dağılımı.

Hayvan türü	Mide içeriği	Pozitif örnek sayısı / %		Negatif örnek sayısı / %	
		Bakteriyoloji	PZR	Bakteriyoloji	PZR
Sığır	31	15 / 48.4	15 / 48.4	16 / 51.6	16 / 51.6
Koyun	8	3 / 37.5	3 / 37.5	5 / 62.5	5 / 62.5
Keçi	1	-	-	1 / 100	1 / 100

Soğuk zincirde gönderilen 31 adet sığır, 8 adet koyun ve 1 adet keçi olmak üzere toplam 40 adet fütal atık mide içeriğinden yapılan bakteriyolojik kültür ve PZR sonucunda; sığır örneklerinin 15'i (%48.4) ve koyun örneklerinin 3'ü (%37.5) her iki yöntemle de pozitif bulunmuştur. Keçi örneğinden yapılan incelemede ise her iki yöntemle de pozitiviteye rastlanmamıştır (Tablo 2) (Şekil 1).



Şekil 1. PZR ile elde edilen bazı pozitif ve negatif sonuçlar. M: 100 bp marker (Fermentas, Letonya); P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol; 1, 6, 8, 10, 12, 15, 16: Pozitif örnekler (905 bp); 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 14: Negatif örnekler.

Buna göre, her iki yöntemle de toplam 18 adet pozitif ve 22 adet negatif sonuç elde edilmiştir. Bakteriyolojik kültür ile karşılaştırıldığında PZR'nin sensitivite ve spesifitesi %100 olarak bulunmuştur.

Brucellozisin teşhisinde sperma, kan, fütal iç organlar gibi materyaller kullanılarak konvansiyonel kültürel yöntem ve farklı PZR uygulamalarının karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Ancak fütal mide içeriğinden PZR ile *Brucella* spp.'nin teşhisi ve konvansiyonel kültürel yöntem ile karşılaştırılmasına ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Güler ve ark. (2003)'nin koyun atık fetus mide içeriklerinden brucellozisin teşhisinde, bakteriyolojik kültür ve PZR yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışmada bakteriyolojik kültür ile pozitif sonuç alınan 39 mide içeriğinin 38'inde PZR ile pozitif sonuç elde ederek, PZR'nin spesifite ve sensitivitesini %97.4 olarak tespit etmişlerdir. Aynı

çalışmada bakteriyolojik kültür ile negatif sonuç alınan mide içeriklerinden yapılan PZR ile de aynı sayıda negatif sonuç alınmış ve PZR'nin spesifite ve sensitivitesi negatif örnekler için %100 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu spesifite ve sensitivite değerleri bizim çalışmamızdaki değer ile benzer bulunmuş ve PZR'nin, brucellozisin teşhisinde rutin olarak kullanılabilceği fikri desteklenmiştir. Konvansiyonel kültüre göre mide içeriklerinden direkt yapılan PZR'nin daha kısa zamanda sonuç vermesi brucellozisin teşhisinde önemli bir avantaj olarak belirlenmiştir.

Ülkemizin brucellozis hastalığı için endemik bölge olduğu bilinmektedir. Bu nedenle farklı hayvan türlerinde ve daha fazla örnek sayısı ile *Brucella* spp.'nin tür düzeyinde teşhisi, bununla beraber serolojik olarak belirlenmesinde sıkıntılarla karşılaşılacak aşılı ve aşısız hayvanların ayırımının yapılabilmesi için bundan sonraki çalışmalarda farklı moleküler tekniklerin kullanıldığı çalışmalar hedeflenmektedir.

Kaynaklar

1. Adone R, Ciuchini F, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, (2001). Use of polymerase chain reaction to identify *Brucella abortus* strain RB51 among *Brucella* field isolates from cattle in Italy. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 48(2), 107-113.
2. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
3. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK, (2001). Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. Vet Microbiol. 83(1), 37-44.
4. Aydın N, Paracıkoğlu J, (2006). Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, p. 145-163.
5. Bricker BJ, Halling SM, (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 32(11), 2660-2666.
6. Çetinkaya B, Öngör H, Muz A, Ertaş HB, Kalender HM, Erdoğan HM, (1990). Detection of *Brucella* species

- DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR.* Vet Rec. 144, 239-240.
7. **Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR,** (1990). *Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction.* J Appl Bacteriol. 69(2), 216-227.
 8. **Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzza A, Gallo P,** (2000). *Detection of Brucella species in buffalo whole blood by gene-specific PCR.* Vet Rec. 147, 634-636.
 9. **Güler L, Gündüz K, Ok Ü,** (2003). *Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples.* Vet Microbiol. 93, 53-61.
 10. **Gürtürk K, Alan M, Boynukara B, Solmaz H, Aksakal A,** (1998). *Van ve yöresinde koyunlarda brusellozis üzerine etiyolojik ve serolojik incelemeler.* Ulusal Sığır ve Koyun Yavru Atma Sempozyumu, 6-8 Ekim, Pendik.
 11. **Herman L, De Ridder H,** (1992). *Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction.* Appl Environ Microbiol. 58(6), 2099-2101.
 12. **Hesterberg UW, Bagnall R, Perrett K, Bosch B, Horner R, Gummow B,** (2008). *A serological prevalence survey of Brucella abortus in cattle of rural communities in the province of KwaZulu-natal, South Africa.* J S Afr Vet Assoc. 79(1), 15-18.
 13. **Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C,** (2009). *IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of Brucella spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology.* BMC Vet Res. 14(5), 22.
 14. **Kazemi B, Yousefi Namin SA, Dowlatshahi M, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, Samarghandi A, Mardani M,** (2008). *Detection of Brucella by Peripheral Blood PCR and Comparison with Culture and Serological Methods in Suspected Cases.* Iranian J Publ Health. 37(4), 96-102.
 15. **Leal-Klevezas DSL, Vazques IOM, Merino AL, Soriano JPM,** (1995). *Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals.* J Clin Microbiol. 33, 3087-3090.
 16. **Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Balinsky D, Tabatabai LB,** (1988). *The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic Brucella abortus protein.* Gene. 63(1), 1-9.
 17. **Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I,** (1995). *Specific detection of Brucella DNA by PCR.* J Clin Microbiol. 33(3), 615-617.
 18. **Romero C, Lopez-Goni I,** (1999). *Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of Brucella sp. by PCR.* Applied Environ Microbiol. 3735-3737.
 19. **Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P, Yurtsever SG,** (2009). *Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations.* Pol J Microbiol. 58(1), 15-9.
 20. **Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR,** (2000). *A multiplex approach to molecular detection of Brucella abortus and/or Mycobacterium bovis infection in cattle.* J Clin Microbiol. 38(7), 2602-2610.

Geliş Tarihi / Received: 15.12.2008

Kabul Tarihi / Accepted: 25.12.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. H. Kaan Müştak

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,

Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarı,

06020, Etlik, Ankara, Türkiye

E-posta: kaanmustak@gmail.com

Kınalı keklüklerde (*Alectoris chukar*) *Eimeria tenella* ve *Eimeria kofoidi*'nin neden olduğu koksidiyozis olgusu

Armağan Erdem ÜTÜK¹, F. Çiğdem PİŞKİN¹

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

Özet: Laboratuvarımıza gönderilen üç kınalı keklüğün (*Alectoris chukar*) incelenmesi neticesinde keklüklerde *Eimeria* sp. ookistleri tespit edilmiştir. Tür tayinlerini yapmak amacıyla ookistler uygun koşullarda sporlandırılmıştır. Çalışma sonucunda üç keklüğün de *Eimeria tenella* ve *E. kofoidi* ile enfekte olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Alectoris chukar*, *E. kofoidi*, *E. tenella*, kınalı keklük

Coccidiosis in chukar partridges (*Alectoris chukar*) caused by *Eimeria tenella* and *Eimeria kofoidi*

Summary: As a result of the examination of three chukar partridges sent to our laboratory, *Eimeria* sp. oocysts were detected. With the aim of defining their species, oocysts were sporulated in suitable conditions. The results of the study indicated that all three partridges were infected with *Eimeria tenella* and *E. kofoidi*.

Keywords: *Alectoris chukar*, chukar partridge, *E. kofoidi*, *E. tenella*

Giriş

Keklikler biyolojik sınıflandırmada *Galliformes* (Tavuğumsular) takımının *Phasianidae* (Sülüngiller) ailesinde bulunmaktadır. Avcılık, et üretimi ve yumurtası için yetiştirilmektedir. Farklı cinslere ait birçok türü ve alt türü bulunmaktadır. Ülkemizde en yaygın olarak bulunan ve ticari üretime en iyi adapte olan tür ise kınalı keklüktür (*A. chukar*) (İNANÇ, 2001).

Keklik ve sülün gibi av kuşlarının ticari amaçlı olarak yoğun bir şekilde yetiştirildiği sürülerde paraziter hastalıkların yayılımı artabilmektedir. Koksidiyozisin tavuk çiftliklerinde olduğu gibi, av kuşlarının yetiştirildiği çiftliklerde de yaygın olduğu bildirilmektedir (BOLOGNESI ve ark., 2006). Ancak hastalığın av kuşları arasındaki yaygınlığı ve hastalığa neden olan türler hakkında pek fazla literatür bulunmamaktadır.

Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalar sonucunda keklüklerde *E. tenella*, *E. caucasia*, *E. kofoidi*, *E. alectoreae*, *E. gonzalezi*, *E. coturnicis*, *E. lyruri*, *E. procera*, *E. teetari* ve *E. legionensis* türleri tespit edilmiştir (BHATIA ve ark., 1966; BOLOGNESI ve ark., 2006; DUMANLI ve ÖZER, 1985; KÖROĞLU ve TAŞAN, 1995; ZAPRIANOV, 1976).

Bu çalışmada; Çankırı bölgesindeki bir kınalı keklük işletmesinde koksidiyozise neden olan türlerin tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini 2009 yılının Mayıs ayında Çankırı bölgesinden Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji Laboratuvarına gönderilen üç kınalı keklüğe ait bağırsaklar oluşturmuştur. Alınan anamnezde sürüde 400 keklüğün bulunduğu, 100'ünün hastalandığı ve üçünün öldüğü, hasta hayvanlarda iştahsızlık, durgunluk, kambur duruş ve ishal gibi klinik semptomların görüldüğü belirtilmiştir.

Laboratuvara gönderilen bağırsaklar usulüne uygun olarak açılmış ve yeterli miktarda dışkı alınarak çinko sülfat ($ZnSO_4$) flotasyon metodu ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda keklüklerin dışkısında *Eimeria* sp. ookistleri tespit edilmiştir.

Eimeria sp. ookistleri saptanan dışkı örnekleri serum fizyolojik ile karıştırıldıktan sonra süzülmüş, %2.5'lük potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) içeren petrilere ince bir tabaka halinde yayılmış ve 25-27°C'de sporlanmaya bırakılmıştır. Örnekler cam bagetle günde birkaç kez karıştırılmış ve

petrilerde potasyum dikromat azaldıkça ilave edilmiştir.

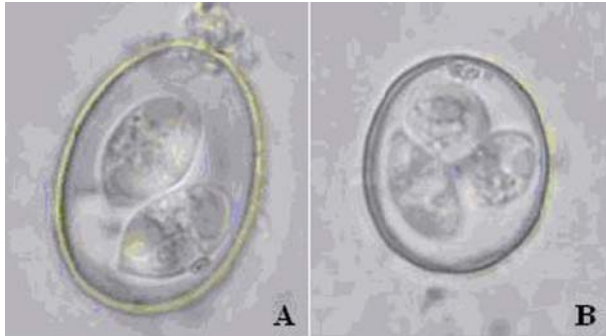
Aynı türden sporlanmış ookistlerin 15 tanesi şekil, büyüklük, ookist artığı, stieda cisimciği, polar granül, mikropil, kep ve refraktil globüllerin mevcut olup olmadığı yönünden incelenmiş ve morfolojik özellikleri belirlenerek ilgili literatürler ışığında teşhisleri yapılmıştır (BOLOGNESI ve ark., 2006; CAMPILLO ve HERNANDEZ, 1966; DUMANLI ve ÖZER, 1985; KÖROĞLU ve TAŞAN, 1995; MORGAN ve HAWKINS, 1949).

Bulgular

Yapılan incelemeler sonucunda kekliklerde *E. tenella* ve *E. kofoidi*'nin neden olduğu miksoenfeksiyon tespit edilmiştir.

Eimeria tenella ookistlerinin oval şekilli, boyutlarının 23-25×16-18 (ortalama 23.7×17.4) µm, boy/en oranının 1.36 µm olduğu, ookist artığı, mikropil ve kepe sahip olmadığı, polar granüle sahip olduğu, sporokistlerinin boyutlarının 10-12×6-8 (ortalama 11.6×7) µm, boy/en oranının 1.65 µm olduğu, stieda cismi ve refraktil globüle sahip olduğu tespit edilmiştir.

Eimeria kofoidi ookistlerinin yuvarlak şekilli, boyutlarının 18-22×15-19 (ortalama 20.4×17.3) µm, boy/en oranının 1.18 µm olduğu, ookist artığı, mikropil ve kepe sahip olmadığı, polar granüle sahip olduğu, sporokistlerinin boyutlarının 10-11×6-7 (ortalama 10.5×6.9) µm, boy/en oranının 1.51 µm olduğu, stieda cismi ve refraktil globüle sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil. Sporlanmış ookistler, A: *E. tenella*, B: *E. kofoidi*.

Tartışma ve Sonuç

Dumanlı ve Özer (1985), Elazığ bölgesinde avcılar tarafından vurulan 60 keklikten (*Alectoris graeca*) elde ettikleri dışkı materyalini incelemiş, keklik-

lerden 9'unun *E. caucasica*, 15'inin *E. kofoidi* ve 14'ünün her iki türle enfekte olduğunu tespit etmiştir.

Köroğlu ve Taşan (1995), Elazığ ve Tunceli yörelerinde 50 keklik (*A. graeca*) üzerinde yaptıkları inceleme sonucunda, kekliklerin 9'unda *E. alectoreae*, 19'unda *E. caucasica*, 2'sinde *E. coturnicis*, 2'sinde *E. gonzalezi* ve 38'inde *E. kofoidi* türlerini tespit etmiştir.

Türkiye'de keklikler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda (DUMANLI ve ÖZER, 1985; KÖROĞLU ve TAŞAN, 1995) 5 farklı *Eimeria* türü tespit edilmiştir. Bu çalışma Çankırı bölgesinden laboratuvarımıza gönderilen üç kınalı keklik (*A. chukar*) üzerinde yürütülmüş olup, kekliklerde Türkiye'de belirtilen türlerden farklı olarak *E. tenella* tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda; Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan evcil ve yabani kekliklerin paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi gerektiğine, koksidiyozisin keklik yetiştirilen işletmelerde önemli kayıplara neden olabileceğine ve yetiştiricilerin bu konuda bilinçlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Bhatia BB, Pandey TP, Pande BP, (1966). *Eimeria teetari n. sp. (Eimeriidae: Sporozoa) in Indian partridges*. Acta Vet Acad Sci Hung. 16, 329-334.
2. Bolognesi PG, Galuppi R, Catelli E, Cecchinato M, Frasnelli M, Raffini E, Marzadori F, Tampieri MP, (2006). *Outbreak of Eimeria kofoidi and E. legionensis coccidiosis in red legged partridges (Alectoris rufa)*. Ital J Anim Sci. 5, 318-320.
3. Campillo MC, Hernández MP, (1966). *Sobre las coccidiosis de las perdices, con descripción de Eimeria legionensis n. sp., parasita de alectoris rufa L. Y una clave para su diferenciación*. Rev Iber Parasitol. 26, 27-41.
4. Dumanlı N, Özer E, (1985). *Elazığ yöresinde kekliklerde (Alectoris graeca) görülen Eimeria türleri ve yayılışları*. Selçuk Üniv Vet Fak Derg. 1 (1), 95-99.
5. İnanç S, (2001). *Kahramanmaraş Kapıçam Keklik Üretim İstasyonunda kınalı keklik üretim teknikleri üzerine araştırmalar*. Araştırma projesi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı, Proje no: 2001/7-2.
6. Köroğlu E, Taşan E, (1995). *Elazığ ve Tunceli yörelerinde bıldırcın ve kekliklerde bulunan Eimeria (Protozoa, Eimeriidae) türleri ve bunların yayılışı*. Turk J Vet Anim Sci. 19, 187-191.
7. Morgan BB, Hawkins PA, (1949). *Veterinary Protozoology*. Second edition. U.S.A: Burgess Publishing Company, Minnesota, p.102.

- 8. Zaprianov M,** (1976). *Coccidia and coccidiosis in the rock partridge, Alectoris graeca cypriates. I. Coccidian species, systematics and morphological characteristics and the seasonal and age-related dynamics.* Vet Med Nauki. 13 (5), 78-83.

Geliş Tarihi / Received: 23.10.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. Armağan Erdem Ütük

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,

Parazitoloji ve Arı Hastalıkları Laboratuvarı,

06020 Etlik, Ankara, Türkiye

E-posta: erdemutuk@hotmail.com

Batı Nil Virus enfeksiyonu

Arife ERTÜRK¹, M. Fatih BARUT¹, Şirin G. ÇİZMECİ¹

¹Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Virolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Özet: Batı Nil Virus'u; insanlar, atlar, kuşlar ve vahşi hayvanlarda çeşitli nörolojik semptomlara neden olan ve vektörlerle (artropodlarla) bulaşan *Flaviviridae* ailesine mensup zoonoz bir arbovirusdur. Afrika, Asya ve Güney Avrupa'da uzun süredir bilinen hastalık, son zamanlarda insanlarda ve tek tırnaklılarda ensefalit vakası ile seyreden hastalık tablosuna sebep olmaktadır. Küresel ısınma sonucu oluşan iklim değişiklikleri ile bu virusun taşıyıcısı olan vektörlerin de yaşam alanları değişmiş ve yaygınlıkları artmıştır. Bu derlemede; virusun etiyolojisi, dünyadaki yaygınlığı, patogenezi, belirtileri, tanı yöntemleri ve mücadelesi ile ilgili konular ele alınmıştır.

Anahtar sözcükler: Batı Nil Virus, ensefalitis, sivrisinek

West Nile Virus infection

Summary: West Nile Virus; is a zoonosis arbovirus which belongs to *Flaviviridae* family and causes different neurological symptoms in humans, horses, birds and wild animals and spreads via arthropods. As a known disease in Africa, Asia and South Europe for a while, West Nile causes encephalitis in equids and humans recently. In consequence of climate changes which is a result of global warming, living area of vectors are changed and prevalence of vectors is increased. In this article, etiology, prevalence, pathogenesis, symptoms and diagnostic techniques of the virus and combating are discussed.

Keywords: Encephalitis, mosquito, West Nile Virus

Giriş

Afrika, Asya ve Güney Avrupa'da uzun süredir bilinen hastalık son yıllarda Kuzey Amerika ve Avrupa'nın ılıman bölgelerinde, insanlarda ve tek tırnaklılarda artan ensefalit vakası ile seyreden salgınlara sebep olmaktadır (BURKE ve ark., 2001). Virus ilk defa 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil bölgesinde ateşli 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. Bu bölgelerde Batı Nil Virus (BNV) enfeksiyonu genellikle hafif ve subklinik seyirli olarak görülmüşse de, 1990'ların başından itibaren enfeksiyonun insanlardaki sıklığı ve ciddiyeti artmıştır. Enfeksiyon daha önceleri etkilenmemiş bölgelerde de görülmeye başlamıştır. Buna en çarpıcı örnek olarak virusun 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin New York şehrinde görülmesi ve bunu takip eden 3 yıl içerisinde Kuzey Amerika'da ki hayvanlar ve insanlarda yayılması verilebilir (CDC, 2003).

Etiyoloji ve Epidemiyoloji

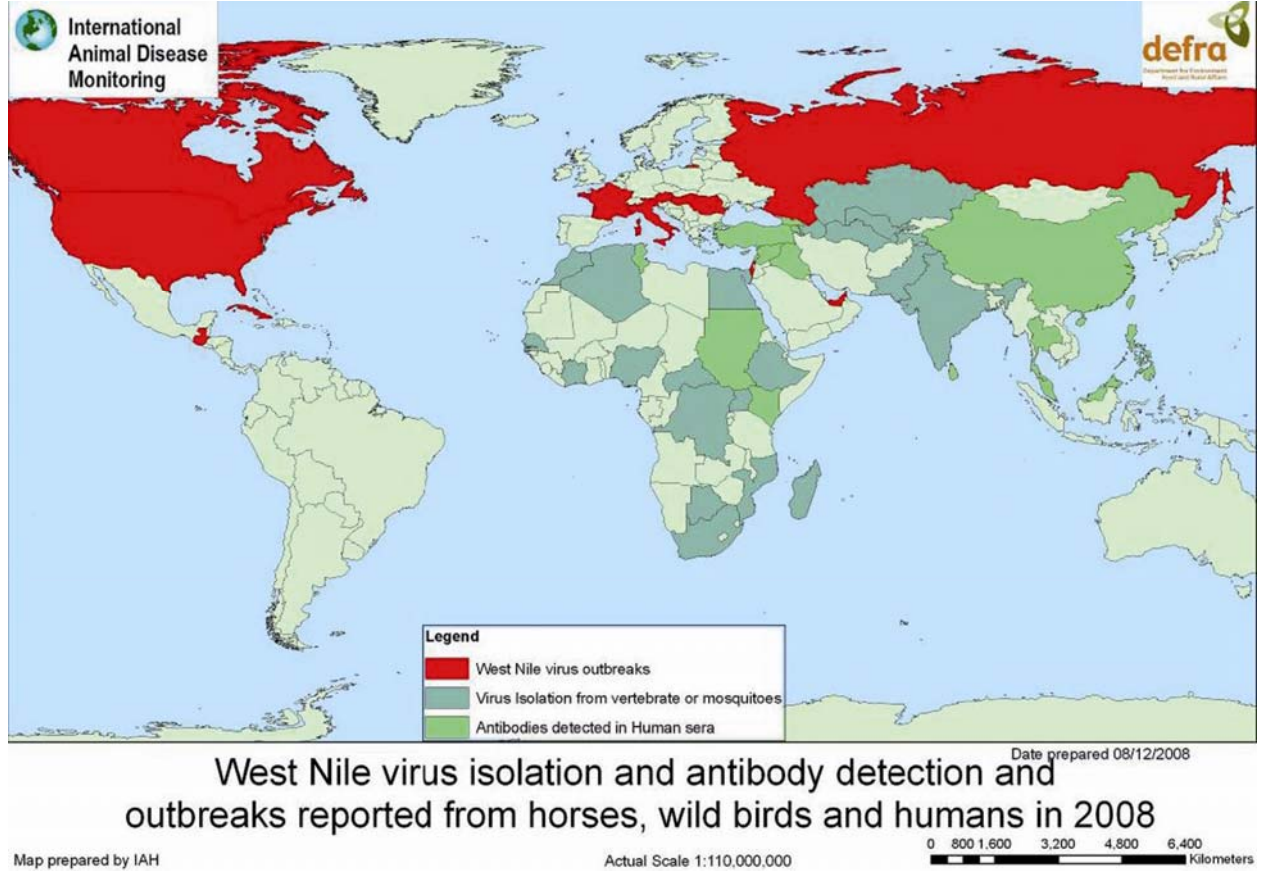
Batı Nil Virus, taksonomik olarak *Flaviviridae* familyasının *Flavivirus* cinsinde yer alır (MONARTH ve HEINZ, 1996; SAMPATHKUMAR, 2003). Etken aynı zamanda Japon Ensefalit Virus (JEV), St. Louis Ensefalit Virus (SLEV), Murray Vadisi Ensefalit Virus (MVEV) ve Kunjin Virus'unun da içinde bulunduğu JE serokompleksi içinde yer almaktadır.

Virus, ikozahedral simetridir, zarflı, pozitif polariteli, tek iplikçikli bir RNA virusudur. Genom yaklaşık 12000 nükleotid uzunluktadır (MONARTH ve HEINZ, 1996; PETERSEN ve ROEHRING, 2001). Virion çapı 45-50 nm büyüklüğündedir (SAMPATHKUMAR, 2003; MCMINN, 1997). Dış ortamlara dayanıklı olmayan BN virusu, ısı, lipit çözücüler veya deterjan içeren dezenfektanlar içinde süratle inaktive olur (SAMPATHKUMAR, 2003; DIAMOND, 2003). BNV izolatları, filogenetik olarak iki hat üzerinde gruplanmaktadır. Birinci hat, Kuzey ve Orta Afrika, İsrail, Avrupa, Hindistan, Avustralya (Kunjin

virus), Kuzey ve Orta Amerika ve Güney Amerika da Kolombiya ve Arjantin'de görülmüştür (MORALES ve ark., 2006). İkinci hat, Orta ve Güney Afrika ve Madagaskar'da endemik olarak hastalığa neden olmuştur. Her iki hattın da Orta Afrika'da birlikte sirkülasyon içinde bulunduğu rapor edilmiştir (BERTHET ve ark., 1997; BURT ve ark., 2002). Son zamanlarda Macaristan'da hat 2 bildirilmiştir. İnsan ve atlarda meydana gelen son salgınlar birinci hattın kaynaklansa da her iki hat da insan ve hayvanlarda hastalığa neden olmaktadır.

BNV, 20'nci yüzyılın ilk yarısında Afrika'da insan patojeni olarak tanımlanmıştır. Her ne kadar daha önce BNV salgınları tanımlansa da 1996'dan önce insanlarda BNV sonucu meydana gelen ensefalit ile nadiren karşılaşmıştır. Bu tarihten sonra Romanya, Rusya, İsrail, Kuzey Amerika, Fransa ve Tunus'ta BNV ensefalit salgınları bildirilmiştir (BIN ve ark., 2001; DEL GIUDICE ve ark., 2004; HAYES, 2001; HUBALEK ve HALOUZKA, 1999; ZELLER ve

SCHUFFENECKER, 2004). 1960'lar boyunca Mısır ve Fransa'dan atlarda BNV ensefaliti rapor edilmiştir (PANTHIER ve ark., 1966; SCHMIDT ve EL MANSOURY, 1963). 1998'den itibaren Fransa, İtalya, Kanada, Amerika, İsrail ve Ceza-yir'de hastalık görülmüştür (CANTILE ve ark., 2000; HAYES ve ark., 2005; MURGUE ve ark., 2001; OSTLUND ve ark., 2000). Batı yarımkürede virus yayılım alanı, New York'un doğu kıyısı boyunca ayrılmış bir bölge şeklinde gözle görülür şekilde genişlemiş ve Amerika Birleşik Devletleri'nin eyaletlerini, Kanada, Meksika, Karayip Adaları, Orta Amerika, Arjantin, Kolombiya ve Venezuela'yı içine almıştır (DAVIS ve ark., 2005; MORALES ve ark., 2006; OSTLUND ve ark., 2000; USDA, 2006). USA ve Kanada dışında, Batı Nil Virüsü'nün batı yarımküreye girişi büyük salgınlar veya belirgin ölümler ile karakterize edilmemiştir, muhtemelen bu durum bu bölgelerde yerel (endojen) flavivirusların bulunup, sirküle olmalarından kaynaklanmaktadır. BNV'nin dünyadaki dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. BNV'nin 2008 yılında dünyadaki dağılımı (Defra'dan alınmıştır).

Patogenez ve Patoloji

BNV ensefalitinin inkübasyon süresi sivrisinek ısırmasından sonra yaklaşık 3-15 gündür. Klinik bulguların ortaya çıkmasından önce düşük titreli ve kısa süren bir viremi devresi yaşanır (BUNNING ve ark., 2002; SCHMIDT ve EL MANSOURY, 1963). BN viral ensefaliti ancak az miktarda ata görülür. Hasta atların büyük çoğunluğu klinik bulgu göstermez (OSTLUND ve ark., 2000). Atlardaki hastalık sıklıkla hafiften şiddetliye değişen ataksi ile karakterizedir. Ayrıca atlar zayıflık, kas çekmesi ve baş sinirlerinde fonksiyon bozukluğu gösterebilir (CANTILE ve ark., 2000; OSTLUND ve ark., 2000; OSTLUND ve ark., 2001; SNOOK ve ark., 2001). Ateş her zaman görülmeyen bir bulgudur. Hastalık belirtileri ortadan kalkabilir veya hayvanın boylu boyunca uzanması ile sonlanabilir. Ölüm oranı yaklaşık olarak klinik olarak etkilenen üç attan biri şeklindedir.

Birçok kuş türü BNV ile infekte olabilir. Fakat hastalığın klinik olarak ortaya çıkması değişkendir. Tavuklar ve hindiler hastalığa dirençlidir. Ölümcül sinirsel hastalık salgınları USA'da hayvanat bahçesi kuşlarında, İsrail ve Kanada'da evcil kazlarda (AUSTIN ve ark., 2004; STEELE ve ark., 2000; ZELLER ve SCHUFFENECKER, 2004) bildirilmiştir. BNV, lokal viral aktivitenin yoğun olduğu zamanlarda diğer bazı hayvan türlerinde de sporadik hastalık ile ilişkili bulunmuştur, bunların arasında sincap, yarasa, köpek, kedi, geyik, ren geyiği, koyun, alpaka, timsah ve liman ayıbalıkları bulunmaktadır. Birçok insanın enfeksiyonu sivrisinekten doğal yolla alması yanında laboratuvar enfeksiyonları da bildirilmiştir. Klinik şüpheli durumlarda, tüm hayvanlardan alınan teşhis örnekleri, özellikle kuşlardan alınan örnekler, 3'üncü derece biyogüvenlik düzeyindeki laboratuvarlarda, uygun laboratuvar yöntemleri kullanılarak test edilmelidir (RICHMOND ve MCKINNEY, 1999). BNV'nin insanlara kan nakli, organ nakli ve emzirme yolu ile geçtiği doğrulanmıştır.

Virus replikasyonu ve yayılmasında konakçı ve vektör ilişkisi önemli yer tutar ve vektörlerin çoğunda patolojik değişiklikler görülmez (MONARTH ve HEINZ, 1996). Kan emen artropodlar beslenmek amacıyla infekte konakçıdan kan emerler. Kan yolu ile alınan virus ilk olarak kan emen artropodların mesenteronal epitel

hücrelerini infekte eder ve çoğalır. Daha sonra tükürük bezlerinde çoğalmaya devam ederek buradan konakçıya ısırma-sokma yolu ile subkutan olarak girer (MONARTH ve HEINZ, 1996). İlk replikasyon yeri subkutan Langerhans dendritik hücreleridir (DIAMOND, 2003; MCMINN 1997). Dendritik hücreler bölgesel lenf düğümlerini infekte ederken interferon tip-1 ve tip-2 salgılayarak kontagiyöz yayılmayı sınırlandırır (DIAMOND, 2003). İnfekte lenf düğümlerinde virus makrofajlar, B hücreleri, foliküler dendritik hücrelerin yer aldığı hücrelerde replike olur. Daha sonra infeksiyöz virus afferent kanallara çıkar ve torasik kanal aracılığıyla dolaşıma katılarak viremi oluşturur (DIAMOND, 2003; MCMINN, 1997). Viremi esnasında birçok ekstrasöral doku hematojen yolla virus tarafından infekte edilir ve bu dokulardan virusun salınımı viremiyi devam ettirir (MCMINN, 1997). Virus sinir sistemine ulaştığı devrede hücrelerde fonksiyon bozukluğu, erimeye, dokularda yangıya neden olur (MONARTH ve HEINZ, 1996). Virusun beyne girişi, viremik faz sırasındadır, ancak doğal enfeksiyon süresince virus partiküllerinin kan-beyin bariyerini nasıl geçtiği hala bilinmemektedir (MONARTH ve HEINZ, 1996; DIAMOND, 2003; MCMINN, 1997). Ölümcül BNV enfeksiyonunun patolojik bulguları beyinde yaygın bir yangı ve spinal kordonda küçük hemorajilerle yaygın bir nöronal dejenerasyondur (SAMPATHKUMAR, 2003). BNV enfeksiyonunda şekillenen meningo-ensefalitten ölen dört hastanın postmortem patolojik bulgularının perivasküler ve leptomeningial kronik bir yangı, mikroglial nodüller, öncelikle özellikle temporal loblar ve beyin alt taraflarını içine alan nöronofaji şeklinde olduğu belirtilmiştir. Bu bulguların polio benzeri paralize sahip hastaların spinal kordonlarında da göze çarptığı vurgulanmıştır (GILADI ve ark., 2001).

Klinik Belirtiler ve Bulgular

Doğal olarak oluşan enfeksiyonlarda inkübasyon periyodu 2-15 gün arasında olup genel olarak 1-6 gündür (MONARTH ve HEINZ, 1996; SAMPATHKUMAR, 2003; OIE TERRESTRIAL MANUAL, 2008). BNV enfeksiyonu bir çok olguda hafif şiddetle seyredir. BNV öncelikle insanların, atların ve bazı kuş türlerinin hastalığıdır (OIE TERRESTRIAL MANUAL, 2008).

İnsanlarda: Hafif formunda; gribe benzer genel bulgularla seyrederek ve etkilenen birçok insan kendiliğinden iyileşebilir. Bu durumda; ateş, baş ağrısı, karın ağrısı, sırt ağrısı, kas ağrıları, boğazda hassaslaşma, dokununca ağrıma, lenf yumrularında şişme, ishal, iştahsızlık, bulantı ve kusma vardır. Vücudun çeşitli bölgelerinde kızarıklıklar görülür. Belirtiler 3-6 gün sürer.

Ensefalit ile seyreden ağır durumlarda ise; sağlıklı düşünme kabiliyetinde azalma ve zihin karışıklığı, bilinç kaybı, kişide zaman ve yer kavramlarının ortadan kalkması, bayılma, uyuşukluk, çevreden gelen uyarılara verilen tepkilerde azalma, kaslarda zayıflık, boyun tutulması, boyunda sertlik, titremeler, nadiren koma ve felç görülür.

Hastalığa yakalananlardan %1'den azında ağır tablo görülür, ağır durumdaki hastalarda ise %3-%15 arasında değişen oranlarda ölüm vardır. Ağır tablo ve ölüm 55 yaşın üzerindeki bireylerde daha sık görülmektedir. Henüz bağışıklık sistemi yeterince gelişmemiş çocuklar da risk grubundadır. HIV ve kemoterapi gibi bağışıklık sistemini zayıflatacak durumlarda hastalığın ağır seyretmesi söz konusudur. Organ nakli sırasında organın reddini önlemek için uygulanan bağışıklık sistemi baskılayıcılar da bu gruba girer. Hamilelik hastalığın ağır seyretmesinde başka bir risk faktörüdür. Hastalık sonucu kalıcı beyin hasarı ve kalıcı kas zayıflığı gibi komplikasyonlar görülebilir (WEST NİLE VİRUS KLİNİK BULGULAR 1-2009, 2-2009).

Atlarda: BN viral ensefaliti atlarda nadiren görülür ve hasta atların büyük çoğunluğu klinik bulgu göstermez (OSTLUND ve ark., 2000). Atlardaki hastalık sıklıkla hafiften şiddetliye değişen ataksi ile karakterizedir. Ayrıca atlar zayıflık, kas çekmesi ve baş sinirlerinde fonksiyon bozukluğu gösterebilir (OSTLUND ve ark., 2000; OSTLUND ve ark., 2001; SNOOK ve ark., 2001; CANTILE ve ark., 2000). Ateş her zaman görülmeyen bir bulgudur. Tedavi destekleyicidir, belirtiler ortadan kalabilir veya boylu boyunca uzanma ile sonlanabilir. Ölüm oranı yaklaşık olarak klinik olarak etkilenen üç attan biri şeklindedir. Virus ile infekte olan ve klinik hastalık tablosu gösteren atlarda %35-40 oranında ölüm şekillenir ya da hastalığın komplikasyonlarından dolayı ötonazi uygulanır. İyileşme görülen atlarda kalıcı nörolojik semptomlar oluşabilir.

Kuşlarda: Birçok kuş türü hastalığa dirençlidir. Kazlar gibi duyarlı kuşlar, yatmadan başlayıp, kanat paralizine kadar değişen farklı derecede sinirsel bulgular gösterirler. Bunlar, rahatsız edildiklerinde hareket etmek için isteksizdirler veya hareket edemezler, dengesiz hareket de edebilirler. Kazlarda ölüm oranı %20-60 arasında rapor edilmiştir. Destekleyici çözümler dışında tedavisi yoktur (OIE, 2009)

Tanı ve Ayırıcı Tanı

Klinik bulgu göstermeyen BNV enfeksiyonlarının varlığını ortaya koymak için klinik değerlendirme ve laboratuvar testlerinin yapılması gerekir. Laboratuvar testleri direkt etkenin tespitine yönelik ve/veya serolojik olarak yapılır.

Etkenin tespiti: Kuş dokuları genellikle at dokularına göre daha yoğun miktarda virus içerir. Beyin ve omurilik atlardan virus izolasyonu için tercih edilen dokulardır. Kuşlarda, böbrek, kalp, beyin, karaciğer veya barsaktan virus izolasyonu yapılabilir. Hücre kültürleri (tavşan böbrek veya Vero hücreleri vb.) virus izolasyonu için sıkça kullanılır. BNV duyarlı hücre kültürlerinde *cytopathic effect* (CPE) ile ürer. Viral nükleik asit ve viral antijenler, hasta hayvanların dokularında *reverse-transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) ve *immuno-histochemistry* ile teşhis edilebilir. Tek tırnaklı dokularında BNV teşhisinde en duyarlı yöntem *nested RT-PCR*'dir (OIE TERRESTRIAL MANUAL, 2008; LANCIOTTI ve ark., 2000).

Serolojik testler: At serumlarında antikorlar, IgM *capture enzyme-linked immunosorbent assay* (IgM capture ELISA), *haemagglutination inhibition* (HI), IgG ELISA veya plak redüksiyon nötralizasyon (PRN) ile teşhis edilebilir. ELISA ve PRN metotları kuşlarda BNV'ye karşı oluşan antikorlar için en çok kullanılan tekniklerdir. ELISA gibi bazı serolojik tekniklerde St. Louis ensefalit virusu, Japon ensefalit virusu veya tick-borne ensefalit (TBE) gibi ilgili flaviviruslar ile antikor krosreaksiyonları görülebilir. Bu nedenle bu hastalıklardan ayırt edilmelidir ve WN virusu yönünden doğrulanması PRN testi ile yapılmalıdır. Hayvanlarda yapılan serolojik tanı yöntemleri insanlar için uygulananlar ile aynıdır. Teknik olarak daha zor olsa da PRNT ve HI testleri türe bağımlı olmamaları açısından daha kullanışlı olabilirler (LANCIOTTI ve ark., 2000; MARTIN ve ark.,

2000; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003).

BNV ile ilgili çalışmalar ve araştırmalar, güvenlik seviyesi 3 olan laboratuvar (Biosafety Level-3) koşullarında yapılmalıdır (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). Birçok olguda, BNV'nin neden olduğu ensefalitler, diğer arboviral ensefalitlerden ayrılmaz. Ayırıcı tanı açısından BNV meninjitleri, enteroviruslar, HSV-2, HIV nedenli meninjitler ile sulfonamid ve non-steroid yangısal ajanların neden olduğu meninjitlerden ve kuduzdan ayırmak önemlidir (SAMPATHA, 2003).

Ayırıcı teşhiste atlarda görülen diğer arboviral ensefalitler (eastern, western veya Venezuelen equine encephalomyelitis, Japanese encephalitis), equine protozoal myelitis (Sarcocystis neurona), equine herpesvirus-1/4, Borna disease ve kuduz göz önünde bulundurulmalıdır (OIE TERRESTRIAL MANUAL 2008).

BNV Hastalığının Türkiye'deki Durumu

Türkiye'de BNV izolasyonu henüz gerçekleşmemiş olsa da memeli türlerinde serolojik bulgularına rastlanmıştır (ÖZKUL ve ark., 2005; ERGUNAY ve ark., 2007).

Türkiye'de BNV hastalığında son konakçı olan atlarda da klinik konfirmasyonu yapılmış bir vaka bulunmamaktadır. Bilim adamları tarafından insanlarda hastalık ile ilgili bilinç oluşturmak amacıyla, çeşitli derlemeler yapılmıştır (KILIÇ ve DOĞANCI, 2003; YAZICI, 2005a; YAZICI, 2005b).

Tedavi, Korunma ve Kontrol

BNV, OIE üyesi ülkelerde varlığı halinde OIE'ye ihbarı mecburi bir hastalıktır. BNV hastalığının yayılımını önlemede anahtar nokta sivrisinek popülasyonunun kontrolüdür. Atlar, sivrisineklerden korunmalıdır. Aynı şekilde insanlar da sivrisinek sokmasına maruz kalmaktan korunmalıdır, özellikle sivrisineklerin en çok aktif olduğu gün batımı ve şafak alacakaranlıklarında böcek kovucular ve perdeler bu amaçla kullanılabilir. Sivrisineklerin üreme alanları sınırlandırılmalıdır (OIE, 2009).

BNV enfeksiyonunun bilinen bir tedavisi yoktur (SHIMONI ve ark., 2001; LEYSSON ve ark., 2000). Enfeksiyonun tedavisi önce destek tedavisi şeklinde olmalıdır (HUHN ve ark., 2003). BNV ensefaliti olan hastalar hastaneye yatırılmalı ve santral sinir sistemi lezyonları ortadan kaldırılmalıdır. Analjezikler ve antipiretikler hastalığın ılımlı seyrettiği durumlarda yararlı olabilir.

Sadece atlar (insan ve kuşlar için henüz bir aşı geliştirilmemiştir) için geliştirilmiş inaktif, canlı ve rekombinant aşular USA'da kullanılmaktadır. Hastalığın yaygın görüldüğü bölgelerde etkili bir kontrol önlemi olarak aşılama düşünülmelidir. Doku kültüründen elde edilen formol-inaktif BNV aşısı, *canarypoxvirus* vektörlü canlı BNV aşısı, BNV DNA aşısı ve genetik mühendislik ürünü (chimeric) aşı atlarda kullanım için lisans almıştır (OIE TERRESTRIAL MANUAL, 2008).

Vahşi veya gözlenen kuşlarda yapılacak survey çalışmaları, insan ve hayvanların korunmasında uygun önlemler almaları için yararlı bilgiler sağlayabilir. Kargalar hastalığa çok duyarlı olduğu için, survey çalışmalarında, karga ölümlerinin bildirilmesi ve ölü kargaların test edilmesi büyük önem arz eder (OIE, 2009).

Korunmanın tamamı sivrisineklerle mücadele üzerine yoğunlaştırılmıştır. Mücadele: sivrisineklerin aktif olduğu gün batımı ve şafak vakitlerinde dışarıda bulunmaktan kaçınmak veya cildi kapatan giysiler, sivrisinek kovucu (repellent) gibi önlemler almak; içine sivrisineklerin yumurtlayabileceği, içinde su birikebilen eski tekerlek, teneke kutu, kova, şişe vb. şeyleri ortandan kaldırmak; teras veya çatılarda biriken suyun drenajını sağlayan boruların tıkanıklığını kontrol ederek buralarda su birikmesini engellemek; sarnıç, lağım çukuru, fosseptik çukuru, çöp kutuları ve varillerin bir kapakla sıkıca kapatılmasını sağlamak; plastik havuzların haftada bir boşaltılması veya kullanılmadıkları zamanlarda içerde tutulması; saksı ve kuş banyolarındaki suyun haftada bir değiştirilmesi; kayıklarda biriken yağmur suyunun giderilmesi; ev çevresinde içinde su birikebilecek çukurların giderilmesi, drenajın sağlanması; ağaç kökü ve kütüklerde bulunup su tutabilecek deliklerin kapatılması, süs havuzlarında golyan balığı, sivrisinek balığı, kırmızı balık veya küçük renkli balık gibi sivrisinek yiyen balıkların bulundurulması; teras, pencere, kapılardaki

tül eleklerin tamiri olarak bildirilmektedir (WEST NILE VIRUS 1, 2009).

İçinde DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) bulunan sinek kovucular (repellent) üzerinde yapılan çalışmalar bunların insan sağlığı açısından zararsız olduğunu göstermiştir. Uzun koruma için yüksek oranda DEET içeren repellentler kullanılmalıdır. Halk, sivrisineklerin üreme yerleri ve korunma yolları hakkında bilgilendirilmelidir. Hastalıktan ölen veya şüpheli ölü hayvanların (kuşların) ortadan kaldırılması sırasında eldiven ve çift katlı plastik torba kullanılmalıdır (WEST NILE VIRUS 2, 2009).

Kaynaklar

- Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V, (1997). *Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses*. J Gen Virol. 78, 2293–2297.
- Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, Banet C, Weisman Y, Annis E, Gandaku D, Yahalom V, Hindyeh M, Shulman L, Mendelson E, (2001). *West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans*. Ann NY Acad Sci. 951, 127–142.
- Burke DS, Monath TP, (2001). *Flaviviruses*. In: Fields Virology, Fourth Edition, Knipe D.M. & Howley P.M., eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1043–1125.
- Burt FJ, Grobelaar AA, Leman PA, Anthony FS, Gibson GVF, Swanepoel R, (2002). *Phylogenetic relationships of Southern African West Nile virus isolates*. Emerg Infect Dis. 8, 820–826.
- Cantile C, Di Guardo G, Eleni C, Arispici M, (2000). *Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy*. Equine Vet J. 32, 31–35.
- Centers for Disease Control and Prevention, Erişim: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/wnv_factsheet.htm Erişim tarihi: 31.10.2009.
- Centers for Disease Control and Prevention, *Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control*, Erişim: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines-aug-2003.pdf> Erişim tarihi: 31.10.2009.
- Davis CT, Ebel GD, Lanciotti RS, Braut AC, Guzman H, Surin M, Lambert A, Parsons RE, Beasley DWC, Novak RJ, Elizondo-Quiroga D, Green EN, Young DS, Stark LM, Drebot MA, Artsob H, Tesh RB, Kramer LD, Barrett ADT, (2005). *Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates 2001–2004: Evidence for the emergence of a dominant genotype*. Virology. 342, 252–265.
- Del Giudice P, Schuffenecker I, Vandenbos F, Counillon E, Zeller H, (2004). *Human West Nile virus, France [letter]*. Emerg Infect Dis. 10, 1885–1886.
- Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, Ustacelebi S, (2007). *Seroprevalence of West Nile Virus and Tick Borne Encephalitis Virus in Southeastern Turkey: First Evidence for Tick Borne Encephalitis Virus Infections*. Vector Borne and Zoonotic Dis. Volume 7, Number 2.
- Diamond SM, (2003). *Evasion of innate and adaptive immunity by flavivirus*. Immunol Cell Biol. 81: 196–206.
- Giladi M, Cotter ME, Martin AD, (2001). *West Nile encephalitis in Israel 1999: The New York connection*. Emerg Infect Dis. 7, 659–61.
- Hayes CG, (2001). *West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999*. Ann NY Acad Sci. 951, 25–37.
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'leary DR, Campbell GL, (2005). *Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease*. Emerg Infect Dis. 11, 1167–1173.
- Hubalek Z, Halouzka J, (1999). *West Nile fever – a re-emerging mosquito-borne viral disease in Europe*. Emerg Infect Dis. 5, 643–650.
- Huhn DG, Montgomery PS, Dworkin SM, (2003). *West Nile in the United States: An update on an emerging infectious disease*. Am Family Physician. 68, 653–60.
- Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD, (2008). *Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by Culex pipiens mosquitoes*. Plos Pathogens. Vol.4, Issue 6, 1–7.
- Lanciotti SR, Kerst JA, Nasci SR, (2000). *Rapid detection of West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay*. J Clin Microbiol. 38, 4066–71.
- Leysson P, De Clercq E, Neyts J, (2000). *Perspectives for the treatment of infections with flaviviridae*. Clin Microbiol Rev. 13, 67–82.
- McMinn CP, (1997). *The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses*. J Gen Virol. 78, 2711–22.
- Monarth PT, Heinz XF, (1996). *Flaviviruses*. In: Fields NB, ed. Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 961–1034.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Lewis S, Enria D, (2006). *West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006*. Emerg Infect Dis. 12, 1559–1561.
- Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H, (2001). *West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: The return after 35 years*. Emerg Infect Dis. 7, 692–696.
- OIE, *General Diseases Information Sheet*, Erişim: <http://www.oie.int/Eng/ressources/WNV-EN.pdf>, Erişim tarihi: 31.10.2009.
- OIE, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Domestic Animals*, Chapter 2.1.20, Erişim: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.20_WEST_NILE.pdf, Erişim tarihi: 31.10.2009.
- Ostlund EN, Andresen JE, Andresen M, (2000). *West Nile encephalitis*. Vet Clin North Am Equine Pract. 16, 427–441.
- Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ, (2001). *Equine West Nile encephalitis, United States*. Emerg Infect Dis. 7, 665–669.

28. **Ozkul A, Yıldırım Y, Pınar D, Akcalı A, Yılmaz V, Colak D**, (2005). *Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey*. *Epidemiol Infect.* 1-4.
29. **Panthier R, Hannoun CL, Oudar J, Beytout D, Corniou B, Joubert L, Guillon JC, Mouchet J**, (1966). *Isolement du virus West Nile chez un cheval de Camargue atteint d'encéphalomyélite*. *CR Acad Sci (Paris)*. 262, 1308–1310.
30. **Petersen LR, Roehring TJ**, (2001). *West Nile Virus: A reemerging global pathogen*. *Emerg Infect Dis.* 7, 611-4.
31. **Sampathkumar P**, (2003). *West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention*. *Mayo Clin Proc.* 78, 1137-44.
32. **Schmidt JR, El Mansoury HK**, (1963). *Natural and experimental infection of Egyptian equines with West Nile virus*. *Ann Trop Med Parasitol.* 57, 415–427.
33. **Shimoni Z, Niven J, Pitlick S, Bulvik S**, (2001). *Treatment of West Nile Virus encephalitis with intravein immunoglobulin (Letters)*. *Emerg Infect Dis.* 7, 759.
34. **Snook CS, Hymann SS, Del Piero F, Palmer JE, Ostlund EN, Barr BS, Deroschers AM, Reilly LK**, (2001). *West Nile virus encephalomyelitis in eight horses*. *J Am Vet Med Assoc.* 218, 1576–1579.
35. **United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service**, (2006). *Disease Surveillance Information, West Nile Virus*. Erişim: <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/equine/wnv/> Erişim tarihi: 31.10.2009.
36. **West Nile Virus 1**, Erişim: <http://www.doh.state.fl.us/chdGlades/chicken.html>, Erişim tarihi: 08.07.2009.
37. **West Nile Virus 2**, Erişim: <http://www.westnile.com>, Erişim tarihi: 09.07.2009.
38. **West Nile Virus Klinik Bulgular 1.**, Erişim: <http://www.adventisthealthcare.com/adam/Health%20Illustrated%20Encyclopedia/1/007186.htm>, Erişim tarihi: 09.07.2009.
39. **West Nile Virus Klinik Bulgular 2.**, Erişim: <http://www.westnile.com/west-nile-virus-/symptoms-of-west-nile-virus>, Erişim tarihi: 30.10.2009.
40. **Yazıcı Z**, (2005a). *Batı Nil Virusu İnfeksiyonu*. *İnfeksiyon Dergisi*.19(1), 139-143.
41. **Yazıcı Z**, (2005b). *Atlarda Batı Nil Virusu Enfeksiyonu*. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2(1), 45-48.
42. **Zeller HG, Schuffenecker I**, (2004). *West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23, 147–156.

Geliş Tarihi / Received: 28.10.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 02.11.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. Arife Ertürk

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,

Virolojik Teşhis Laboratuvarı,

06020, Etlik, Ankara, Türkiye

E-posta: arife@kkgm.gov.tr

Kontagiyöz equine metritis

H. Kaan MÜŞTAK

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Özet: Kontagiyöz equine metritis (CEM), *Taylorella equigenitalis*'in neden olduğu, atların oldukça bulaşıcı, venereal bir enfeksiyonudur. Hastalık bulguları sadece dişi atlarda görülürken, erkek atlarda herhangi bir patolojik bulgu gözlenmez. CEM, endometritis, servisitit, vajinitit ve geçici infertilite sonucu at yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Anahtar sözcükler: At, kontagiyöz equine metritis, *Taylorella equigenitalis*

Contagious equine metritis

Summary: Contagious equine metritis (CEM) is a highly contagious, venereal infection of horses caused by *Taylorella equigenitalis*. Symptoms of the disease are only seen in mares. Stallions do not exhibit any pathological findings. CEM causes economic loss in horse breeding by endometritis, cervicitis, vaginitis and temporary infertility.

Keywords: Contagious equine metritis, horse, *Taylorella equigenitalis*

Giriş

Kontagiyöz equine metritis (CEM), ilk defa 1976 yılında Ricketts tarafından İngiltere'deki kısraklarda vajinitit ve servisitit bulgusu ile nedeni belirlenemeyen bir genital enfeksiyon olarak tanımlanmıştır. Hastalık 1977 yılında Crowhurst tarafından yine İngiltere'deki bir at çiftliğinde aynı klinik tablo ile rapor edilmiştir. İngiltere'de görülen vakalardan sonra önem kazanan CEM ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış (PLATT ve ark., 1977; TIMONEY ve ark., 1977) ve hastalığın etkeni ilk kez 1978 yılında Taylor ve ark. tarafından *Haemophilus equigenitalis* olarak bildirilmiştir. İngiltere'den sonra CEM, İrlanda (TIMONEY ve ark., 1977), Avustralya (HUGHES ve ark., 1978), Fransa (POWELL ve ark., 1978), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) (SWERCZEK, 1978), Almanya (MUMME ve AHLWEDE, 1979), Belçika (CARTER, 1979) ve Japonya (SUGIMOTO ve ark., 1980) gibi dünyanın birçok ülkesinde bildirilmiştir.

Sugimoto ve ark. (1983) *Haemophilus equigenitalis* ile yaptıkları DNA-DNA hibridizasyon ve genom DNA G+C içeriği çalışmaları ile *H. equigenitalis*'i yeni bir genus olan *Taylorella* genusu içerisine yerleştirmişlerdir. Ta-

nımlanan bu yeni genus 1984 yılında Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi tarafından onaylanmıştır. Jang ve ark. (2001) ise yeni bir tür olan *Taylorella asinigenitalis*'i eşeklerin genital yolundan izole ederek *Taylorella* genusu içerisinde ikinci bir tür olarak tanımlamışlardır. Ancak *T. asinigenitalis* atlarda ve eşeklerde belirgin bir enfeksiyona neden olmamaktadır. Günümüzde CEM hastalığının etkeni olan *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* ile beraber *Alcaligenaceae* familyası içerisinde yer almaktadır (GARRITY ve ark., 2005).

Etiyoloji

T. equigenitalis, Gram negatif, hareketsiz ve sporsuz bir bakteri olup mikroskopide, boyutları 0.3-0.7×0.7-1.8 µm arasında değişen, pleomorfik, kısa çomakçıklar ya da kokobasil şeklinde görülebilmektedir. Etkenin etrafında kapsül benzeri bir yapı bulunabilmektedir (HITCHCOCK ve ark., 1985; HOLT ve ark., 2000). *T. equigenitalis*'in streptomisine duyarlı ve dirençli olmak üzere iki biyotipi bulunmaktadır (TIMONEY, 1996).

T. equigenitalis, optimum olarak 35-37°C'de, mikroaerofilik (%5-10 CO₂) ortamda, X- (hemin) ve V-faktörüne (NAD, nikotinamid adenin

dinükleotid) gereksinim göstermeden çikolata agar üzerinde ürer. Adi besi yerlerinde üremez. Etken katalaz, oksidaz, fosfataz ve fosfoamidaz pozitif olup, indol, H₂S, lizin ve ornitin dekaboksilaz, arjinin dihidrolaz, üreaz, jelatinaz, lipaz ve DNase negatiftir. Ayrıca etken karbonhidratlardan asit oluşturamadığı gibi nitratlarında nitritlere indirgeyememektedir (HOLT ve ark., 2000).

T. equigenitalis'in üretilmesinde %5 oranında defibrine at kanı içeren Eugon agarın 70-80°C'de, 12 dakika bekletilmesiyle hazırlanan çikolata agar kullanılır. Hazırlanan besi yeri 45-50°C'ye soğutulmuş olarak içerisine amphoteresin-B (5 µg/ml), clindamycin (5 µg/ml) ve trimethoprim (1 µg/ml) eklenir. Pepton içeren besi yerlerinde bulunan thymidine, trimethoprim'i inaktive eder. Ancak thymidine phosphorylase içeren lize olmuş defibrine at kanı thymidine'i inaktive ederek trimethoprim'in selektif etkisini göstermesini sağlar. Bu besi yeri *T. equigenitalis*'in her iki biyotipinin izolasyonu için optimum besi yeri olup diğer kommensal bakterilerin üremesini baskılayarak selektif etki gösterir (OIE, 2008).

T. equigenitalis suşlarının genom büyüklüğü yaklaşık olarak 1.5×10⁶ bp'dir. Bu hacim, genomik DNA'nın *Apal*, *NaeI* ve *NotI* enzimleriyle kesilen parçalarının uzunluklarının *crossed-field gel electrophoresis* (CFGE) ile ayrıldıktan sonra toplanmasıyla elde edilmiştir (GARRITY ve ark., 2005). *T. equigenitalis*'in 16S rDNA sekansının, GenBank veritabanındaki girişler ile karşılaştırıldığında, *Pelistega europaea* (%95) (BAVERUD ve ark., 2006), *Alcaligenes xylosoxidans* (%94.2) ve *Bordetella bronchiseptica* (%93.5) ile yakın olduğu anlaşılmıştır. İki farklı *Taylorella* suşunun DNA'sı ile, *Bordetella*, *Moraxella*, *Kingella*, *Legionella*, *Haemophilus* ve *Brucella* türlerinin DNA'ları arasında yapılan hibridizasyon çalışmaları ise, bu türler ile, *Taylorella* arasında belirgin bir yakınlık olmadığını ortaya koymuştur (GARRITY ve ark., 2005).

Epidemiyoloji

CEM ilk kez 1970'li yıllarda tespit edildikten sonra birçok ülkeye hızla yayılmıştır. Enfeksiyonun ülkeler arasında yayılması ithal hayvanlar ve sperma ile olmaktadır. Ortaya çıkabilecek epidemileri önlemek için birçok ülkede safkan at ticaretiyle ilgili katı ithalat kuralları uygulanmasına rağmen en-

feksiyon, CEM'in eradike edildiği ari ülkelerde bile görülebilmektedir. Bunun bir örneği, 25 yıl boyunca CEM'den ari statüde bulunan ABD, enfeksiyonun 2008 yılında patlak vermesidir. Halen Kanada, Avustralya, ABD ve bazı Avrupa ülkelerinden eradike edilmesine rağmen CEM, sporadik olarak diğer ülkelerde görülmekte ve bu durum uluslararası ticareti önemli ölçüde etkilemektedir (ANON., 2009). Ülkemizde ise 1984 yılından beri incelenen *T. equigenitalis*, ilk kez 2001 yılında Özgür ve ark. tarafından endometritis ve infertilite sorunu olan 120 safkan kısrağa ait 81 intrauterin ve 39 klitoral fossa svap örneğinin bakteriyolojik incelemesi sonucunda, 2 kısrağın klitoral fossasından izole edilmiştir.

T. equigenitalis'in doğal konakçısı atlardır. Özellikle safkan atlar enfeksiyona daha duyarlıdır. Eşekler ve bazı laboratuvar kemiricileri deneysel olarak enfekte edilmiştir ancak sığır, domuz, koyun ve kediler, deneysel ve doğal koşullarda hastalanmamaktadır (ANON., 2009).

CEM oldukça bulaşıcı bir hastalık olup, çiftleşme en önemli bulaşma yoludur. Çiftleşmenin yanı sıra suni tohumlama sırasında kullanılan enfekte sperm ve veteriner hekimlere ait kontamine malzemeler de önemli bulaşma kaynaklarıdır. En önemli enfeksiyon kaynağı ise aygırlardır, çünkü bu hayvanlarda enfeksiyon şekillenmediğinden, etken fark edilmeden; uretral fossa ve sinus'da, distal uretra'da, pre-ejakulator sıvıda, penis ve prepisyum'da aylarca veya yıllarca kalarak saçılım gösterir. Kısraklar ise enfeksiyonu geçirdikten sonra, etkeni klitoris, klitoral sinus ve klitoral fossa'da daha az olarak da uterusu asemptomatik olarak taşırlar. *T. equigenitalis* gebe kısraklara bulaşırsa yavru taylar kongenital enfekte doğarlar veya doğum esnasında enfekte olarak hastalığa yakalanırlar. Seksüel olgunluğa gelene kadar bu tayların eksternal genital organlarında kolonize olan etken diğer atlara da bulaşarak salgınlara neden olur (TIMONEY, 1996; AYDIN, 2006).

Patogenez

Etken kısraklarda uretra, serviks, klitoral sinus ve klitoral fossa'ya; aygırlarda ise uretra, uretral fossa ve penis kılıfına yerleşerek kolonize olur. En belirgin lezyonlar uterusu şekillenir. *T. equigenitalis* uterus epiteliyal hücre silialarına tutunur ve endometrium üzerinde proliferasyon olarak epitel hücre

destrüksiyonuna yol açar. Mikroskobide uterusun lamina propriası ve epitelyumuna infiltre olan nötrofiller gözlemlenir (GARRITY, 2005).

Klinik Belirtiler

CEM hastalığı özellikle atlarda görülen venereal bir enfeksiyon olup hastalığın inkübasyon periyodu 2-12 gün arasında değişmektedir. Klinik belirtiler genital organlar ile sınırlıdır. Enfeksiyonu sadece dişi atlarda klinik belirti gösterir. Enfeksiyonu geçirdikten sonra tekrar hastalığa yakalanan dişi ve erkek atlar ise herhangi bir belirti göstermeden etkeni eksternal genital bölgelerinde taşıyarak enfeksiyonun yayılmasında rol oynarlar (TIMONEY, 1996).

Dişi atlarda görülen en önemli bulgu geçici infertilite ve metritis tablosudur. Akut infekte dişi atlarda gri-beyaz renkli vajinal akıntı belirgindir. Bu akıntının miktarı enfeksiyonun şiddetiyle doğru orantılı olarak artar ve yaklaşık 2 hafta boyunca azalarak sonlanır. Sekonder bakteriyel etkenlerin de enfeksiyona karışmasıyla akıntının rengi griden yeşile dönebilir. Spekulum ile yapılan vajinal muayenede, endometritis, servisitis ve vajinitis tabloları gözlemlenebilir. Enfekte atların çoğunda birkaç hafta süren geçici bir infertilite tablosu gelişir. Geçici infertilite şekillenmeyen enfekte atlar gebe kaldığında ise yeni doğan yavru etkeni asemptomatik olarak taşır. Abortus çok nadir de olsa görülebilmektedir. İkinci defa hastalığa yakalanan atlarda ya hiç belirti görülmez ya da enfeksiyon ilkinde oranla çok daha az şiddetli seyreder. CEM sistemik bir enfeksiyon olmadığı için enfekte hayvanlarda ölüm görülmez (ANON., 2009; AYDIN, 2006; TIMONEY, 1996).

Teşhis

CEM'in teşhisinde klinik bulgular, diğer genital enfeksiyonlar ile karışabildiğinden yeterli değildir. Klinik bulguları CEM'i düşündüren enfeksiyonlarda mutlaka laboratuvar testlerinin yapılması gerekmektedir.

CEM'in laboratuvar teşhisi bakteriyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Serolojik testlerden komplement fiksasyon, çabuk lam aglutinasyon, ELISA, pasif hemaglutinasyon ve agar-jel immunodifüzyon teknikleri kullanılmaktadır. Ancak antikorlar akut infekte atlarda, en-

feksiyondan 7 gün sonra görülmektedir. Hatta bazı durumlarda bu süre 2 ile 3 hafta arasına çıkmaktadır. Antikorlar 6 ile 10 hafta kadar kanda gözlemlenebilir daha sonra belirlenemezler. Taşıyıcı kısraklar ve aygırlar seropozitiflik vermediğinden serolojik teşhis bu hayvanlarda kullanılmamaktadır. Anlaşılabileceği üzere serolojik teşhis CEM'in teşhisinde etkili bir yöntem değildir (ANON., 2009).

CEM'in teşhisinde klasik kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Svap numunesi alınacak bölgeler arasında dişi atlarda; vajina, serviks, uterus, fossa klitoris, klitoral sinus, erkek atlarda ise prepisyum, penis, fossa uretralis, uretra ve pre-ejakulasyon sıvısı sayılabilir. Bakteriyolojik teşhis için aseptik koşullarda alınan svap örnekleri, içerisinde aktif *charcoal* bulunan bir transport medium (Amies medium) ile + 4°C'de, 48 saat içerisinde laboratuvara gönderilmelidir (WATSON, 1997). Bunun için önceden hazırlanmış %5-10 defibrine at kanı içeren Eugon agar kullanılmalıdır. Ancak örnek alınan bölgede, kommensal olarak bulunan diğer flora bakterileri ve mantarların üremesini baskılamak için besi yeri içerisine amphoterasin-B (5 µg/ml), clindamycin (5 µg/ml), trimethoprim (1 µg/ml) katılır. Ekimleri yapılan petri kutuları 37°C'de %5-10 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılarak 14 gün boyunca günlük takipleri yapılır. İlk 72 saatte şekillenen koloniler değerlendirilmeye alınmamalıdır. İnkübasyon sonunda S tipli, sarımsı gri, çapları 2-3 mm'den küçük koloniler meydana gelir. *T. equigenitalis* Gram negatif, hareketsiz, kokoid-kokobasil, katalaz, oksidaz ve fosfataz pozitif olup kesin teşhis için standart spesifik antiserum kullanılır (ANON., 2009; AYDIN, 2006; OIE, 2008).

İzolasyon ve identifikasyondaki güçlüklerin üstesinden gelmek için *polymerase chain reaction* (PCR) metodu geliştirilmiş ve birçok ülkede uygulanmaya başlanmıştır. PCR metoduyla akut infekte atların yanı sıra taşıyıcı kısrak ve aygırlar da belirlenebilmektedir. *T. equigenitalis*'in *T. asinigenitalis*'ten ayırımında da PCR kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kültür yöntemiyle karşılaştırıldığında PCR yönteminin daha duyarlı bir test olduğu ve çok az sayıdaki *T. equigenitalis*'i atların ürogenital florasındaki diğer kommensal bakteriler arasından tespit edebildiği ortaya konmuştur (BLEUMINK-PLUYM et al., 1994; ANZAI et al.,

1999; DUQUESNE et al., 2007). PCR testi Japonya'da CEM'in eradikasyonunda kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (ANZAI et al., 2002).

Tedavi

T. equigenitalis, penisilin, ampicilin, eritromisin, kanamisin, tetrasiklinler ve kloramfenikol gibi birçok antibiyotiğe karşı duyarlı olmasına rağmen hiçbir tedavi yöntemi etkenin taşıyıcı kısıraklardan eliminasyonunu garanti edememektedir. Bazı olgularda proksimal genital bölgeden elemine edildikten sonra bile etkenin klitoral bölgede varlığını sürdürdüğü anlaşılmıştır. Bu sebeple özellikle tedavide kullanılacak ilaç, uygulama yolu ve uygulama süresi çok önemlidir (TIMONEY, 1996). Öncelikle her bakteriyel infeksiyonda olduğu gibi uygun antibiyotiğin seçilmesinde etkene spesifik antibiyogram testinin yapılması çok önemlidir. Antibiyogram testinin sonucu beklenmeden hemen tedaviye başlanması gerekiyorsa, taşıyıcı kısırakların genital bölgesindeki bulaşık vajinal akıntı giderildikten sonra klitoral fossa ve sinuslar %4'lük klorheksidin glukonat solüsyonu ile iyice silinip temizlenir. Daha sonra bölgeye nitrofurazon (%0.2) gibi bir antibiyotik pomad uygulanır. Bu tedavi 5 gün süreyle uygulanır (AYDIN, 2006; TIMONEY, 1996). Yapılan bir çalışmada bu tedaviye ek olarak 10 gün boyunca oral yolla antibiyotik (Sulfamethoxazole Trimethoprim 30 mg/kg) tedavisi de uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (KRISTULA, 2004). Tedavi süresi sonunda atlardan kontrol amacıyla tekrar numune alınarak laboratuvara gönderilmelidir. Laboratuvar muayenesi sonucunda etken tekrar teşhis edilirse tedavi tekrarlanmalıdır. Tedaviye yanıt vermeyen kısıraklarda klitoral sinusların cerrahi eksizyonu, düşünülebilecek tedavi uygulamalarındandır (ANON., 2009; TIMONEY, 1996).

Tedavide aygırlardan daha başarılı sonuçlar alınmaktadır. Bu amaçla penis dışarı çıkartılarak uretral fossa, uretral sinus, prepisyum, glans ve korpus penis üzerindeki bulaşık vajinal akıntı temizlendikten sonra bölge %2'lik klorheksidin glukonat solüsyonu ile yıkanır. Daha sonra kısıraklarda uygulanan nitrofurazon (%0,2) pomad genital bölgeye sürülür. Bu tedavi de 5 gün süreyle uygulanmalıdır (TIMONEY, 1996).

Korunma ve Kontrol

CEM'den korunmak için herhangi bir aşı uygulaması bulunmadığından hastalık bulaşmasını önleyici tedbirler alınması gerekmektedir. Bununla ilgili olarak at yetiştiriciliği yapan gelişmiş ülkelerde CEM kontrolü ile ilgili ulusal programlar hazırlanmakta ve kullanılmaktadır. Her ithal edilen at ve sperması ülkeye girmeden önce karantinaya alınıp CEM yönünden test edilmekte, müspet sonuç çıkanların ülkeye girişi engellenmektedir. Ülke sınırları içerisinde ise özellikle aşım döneminden önce hayvanlardan örnekler alınıp laboratuvar muayenelerinin yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte hijyen kurallarına dikkat edilmeli ve etken ile bulaşık ekipmanlar (vajinal spekül, muayene eldiveni, suni tohumlama ekipmanı) kullanılmamalıdır (AYDIN, 2006; ANON., 2009).

Kaynaklar

1. Anon., (2009). *Contagious equine metritis*. Erişim adresi: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/Contagious_Equine_Metritis.pdf
2. Aydın N, (2006). *Taylorella Infeksiyonları*. Aydın N, Paracıkoğlu J, eds. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek Yayınları, Ankara. p. 195-203.
3. Anzai T, Eguchi M, Sekizaki T, Kamada M, Yamamoto K, Okuda T, (1999). *Development of a PCR test for rapid diagnosis of contagious equine metritis*. J Vet Med Sci. 61, 1287-1292.
4. Anzai T, Wada R, Okuda T, Aoki T, (2002). *Evaluation of field application of PCR in the eradication of contagious equine metritis from Japan*. J Vet Med Sci. 64, 999-1002.
5. Baverud V, Nyström C, Johansson KE, (2006). *Isolation and identification of Taylorella asinigenitalis from the genital tract of a stallion, first case of a natural infection*. Vet Microbiol. 116, 294-300.
6. Bleumink-Pluym NMC, Werdler ME, Houwers DJ, Parlevliet JM, Colenbrander B, van der Zeijst BAM, (1994). *Development and evaluation of PCR test for detection of Taylorella equigenitalis*. J Clin Microbiol. 32, 893-896.
7. Carter GC, (1979). *Contagious equine metritis*. Anim Quarantine. 6, 1-5.
8. Crowhurst RC, (1977). *Genital infection in mares*. Vet Rec. 100, 476.
9. Duquesne F, Pronost S, Laugier C, Petry S, (2007). *Identification of Taylorella equigenitalis responsible for contagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction*. Res Vet Sci. 82, 47-49.
10. Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, eds., (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2 The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Second Edition. New York Berlin Heidelberg: Springer, p. 684-685.

11. Hitchcock PJ, Brown TM, Corwin D, Hayes SF, Olzowski A, Todd WJ, (1985). *Morphology of three strains of contagious equine metritis organism*. Infect. Immun. 48, 94–108.
12. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, eds., (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 102.
13. Hughes KL, Bryden JD, MacDonald F, (1978). *Equine contagious metritis*. Aust Vet J. 54, 101.
14. Jang SS, Donahue JM, Arata AB, Goris J, Hansen LM, Earley DL, Vandamme PAR, Timoney PJ, Hirsh DC, (2001). *Taylorella asinigenitalis sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (Equus asinus)*. Int J Syst Evol Microbiol. 51, 971–976.
15. Kristula MA, Smith BI, (2004). *Diagnosis and treatment of four stallions, carriers of the contagious metritis organism-case report*. Theriogenology. 61, 595-601.
16. Mumme J, Ahlswede L, (1979). *Isolation von Haemophilus equigenitalis from the cervical swab of a halfbred mare*. Dtsch Tieraerztl Wochenschr. 86, 257–259.
17. OIE (Office International des Epizooties), (2008). *Contagious equine metritis*, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 2.5.2., p. 838-844.
18. Ozgur NY, Ikiz S, Carioglu B, Kilcarslan R, Yilmaz H, Akay O, Ilgaz A, (2001). *Contagious equine metritis in Turkey: first isolation of Taylorella equigenitalis from mares*. Vet Rec. 149, 120-122.
19. Platt H, Atherston JG, Orskov I, (1977). *Klebsiella and enterobacter organisms isolated from horses*. J Hyg Camb. 77, 401-408.
20. Powell DG, David JSE, Frank CJ, (1978). *Contagious equine metritis: the present situation reviewed and revised code of practice for its control*. Vet Rec. 103, 339–402.
21. Sugimoto C, Isayama Y, Kashiwazaki M, Fujikura T, Mitani K, (1980). *Detection of Haemophilus equigenitalis, the causal agent of contagious equine metritis, in Japan*. Natl Inst Anim Health Q (Jpn.). 20, 118–119.
22. Sugimoto C, Isayama Y, Sakazaki R, Kuramochi S, (1983). *Transfer of Haemophilus equigenitalis Taylor et al. 1978 to the genus Taylorella gen. nov. as Taylorella equigenitalis comb. nov.* Curr Microbiol. 9, 155–162.
23. Swerczek TW, (1978). *Contagious equine metritis in USA*. Vet Rec. 102, 512–513.
24. Taylor CED, Rosenthal RO, Brown DFJ, Lapage SP, Hill LR, Legros RM, (1978). *The causative organism of contagious equine metritis 1977: proposal for a new species to be known as Haemophilus equigenitalis*. Equine Vet J. 10, 136-144.
25. Timoney PJ, Ward J, Kelly P, (1977). *A contagious genital infection of mares*. Vet Rec. 101, 103.
26. Timoney PJ, (1996). *Contagious equine metritis*. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 19, 199–204.
27. Watson ED, (1997). *Swabbing protocols in screening for contagious equine metritis*. Vet Rec. 140, 268-271.

Geliş Tarihi / Received: 02.11.2009

Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2009

Yazışma adresi / Corresponding author

Dr. H. Kaan Müştak

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,

Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarı,

06020, Etlik, Ankara, Türkiye

E-posta: kaanmustak@gmail.com

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, Arial), 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 bulunmamalıdır. 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 bölümlemesi 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. Ayrı 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 (istatistiki 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 olmalıdır. 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 tekrarından 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, yayının yanına a ve b şeklinde belirtilmelidir.
- ◆ Makalenin adı İtalik yazı karakteri ile yazılmalıdır.
- ◆ Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır.
- ◆ Cilt ve sahife numaraları yer almalıdır.

1. Süreli Yayın

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

2. Yazarlı Kitap

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

3. Editörlü Kitap

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

4. Editörlü Kitapta Bölüm

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

5. Kongre Bildirileri

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

6. Tezler

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

- ◆ Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayınlanır.
- ◆ Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.
- ◆ Düzeltmesi için geri gönderilen yazıların en geç 15 gün içerisinde tekrar yayın kuruluna ulaştırılması gereklidir.
- ◆ Yayınlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.
- ◆ Ayrı basım istenmesi durumunda ücretleri yazarlar tarafından ödenir.
- ◆ Tablo ve şekil başlıkları, Türkçe ve yabancı dilde yazılmalıdır.
- ◆ Kısaltmalar, semboller ve ölçüler: Yazarlar her bir bilimsel kısaltmanın açılımını metinde ilk geçtiği yerde açıklamalıdır.
- ◆ Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Systeme Internationale)'ye göre verilmelidir.
- ◆ Çok yazarlı çalışmalarda yazışma adresi olarak yazarlardan sadece birinin adı belirtilmelidir.

◆ Dergide yayımlanmak üzere gönderilen makaleler tüm yazarlar tarafından imzalanan “Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi” ile birlikte gönderilmelidir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, istendiğinde Yayın Komitesi’nin basıma ilişkin kararı, yazarına/yazarlarına bildirilir.

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

◆ Dergide yayımlanan her türlü makalenin sorumluluğu yazarlarına aittir.

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

◆ Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

Etlik Journal of Veterinary Microbiology

Publication Conditions

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

tioned 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 JI, (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. Yayımlanmak üzere gönderilen bu makalenin tüm sorumluluğunu da yazar/lar üstlenmektedir.

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

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

Yazışma Adresi:

Copyright Release

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: