

ISSN 1016-3573



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



# **ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ**

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

**Cilt/Volume 22 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2011**



---

**Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**  
**Cilt/Volume 22 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2011**  
**Journal of Etlik Veterinary Microbiology**  
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year  
ISSN 1016-3573

---

**Sahibi**

Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına  
Uzm.Vet.Hek. Kadir Kaya  
Enstitü Müdürü V.

**Editörler Kurulu / Editorial Board**

Baş Editör / *Editor-in Chief*  
Uzm.Vet.Hek. Kadir Kaya

Editör Yardımcıları / *Co-Editors* \*

Dr. Erhan Akçay  
Uzm.Vet.Hek. Yıldız Ayaz  
Dr. Asiye Dakman  
Dr. Arife Ertürk  
Dr. Uğur Küçükayan  
Dr. Yavuz Ulusoy  
Dr. Armağan Erdem Ütük  
Uzm.Vet.Hek. M. Kadri Yavuz

**Adres / Address**

Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü  
06020 Etlik – Ankara / TÜRKİYE  
Tel : 90 (312) 326 00 90 (10 hat)  
Faks : 90 (312) 321 17 55

URL : <http://www.etlikvet.gov.tr/yayinlar.htm>  
E-posta : [ehh.o@tr.net](mailto:ehh.o@tr.net) / [ehh.o@etlikvet.gov.tr](mailto:ehh.o@etlikvet.gov.tr)

**Danışma Kurulu / Advisory Board \***

Prof.Dr. Münir Aktaş	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Kürşat Altay	Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. İsmail Bayram	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD
Doç.Dr. Alper Çiftçi	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Seval Bilge Dağalp	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Osman Erganiş	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Dinç Eşsiz	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Murat Karahan	Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Mehmet Taner Karaoğlu	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Osman Kaya	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Oktay Keskin	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Hakan Yardımcı	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Murat Yıldırım	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

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

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

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2011, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2011, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayinevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisan yayinevi@gmail.com

## İçindekiler / Contents

### Araştırma Makaleleri / Research Articles

Sayfa /Page

<b>Tavuklarda <i>Mycoplasma gallisepticum</i> infeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile teşhisi</b> Diagnosis of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> infection in chickens by polymerase chain reaction (PCR) Seyda Cengiz, Orkun Babacan, Gökçen Dinç, Mehmet Akan .....	45
<b>Phylogenetic relationships of three bat species from Turkey</b> Türkiye’de bulunan üç yarasa türü arasındaki filogenetik ilişkiler İrfan Albayrak, Hikmet Ün, Nursel Aşan, Nil Ünal, Thomas Müller, Conrad Freuling, Orhan Aylan .....	49
<b>The investigation of prevalence, vancomycine resistance and slime factor production of enterococci isolated from chicken carcasses</b> Tavuk karkaslarında <i>Enterococcus</i> spp. prevalansı ile vankomisin dirençliliği ve slime faktör üretme yeteneklerinin araştırılması Belgin Sırken, Arzu Fındık, Gökhan İnat, Özgür Çadırcı, Tahsin Onur Kevenk .....	54
<b>Ankara, Konya ve Bolu illerinden toplanan ruminant ve kanatlı yemlerinde toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve okratoksin A kalıntılarının araştırılması</b> Investigation of the total aflatoxin, aflatoxin B1 and ocratoxin A residues in the ruminant and poultry feeds obtained from Ankara, Konya and Bolu Levent Altıntaş, Hüsamettin Ekici, Ender Yarsan, Serkan Çakır, Mehmet Fatih Evrensel, Berat Selim Tokgöz .....	61
<b>Nevşehir ilindeki köpeklerde Listeriosis ve Toxoplasmosis’in seroprevalansının araştırılması</b> Investigation of the seroprevalence of Listeriosis and Toxoplasmosis in dogs in Nevşehir province Akın Kırbaş, Cahit Babür, İbrahim Balkaya, Ünal Yavuz .....	68
<b>Derleme / Review</b>	
<b>Köpeklerde Babesiosis</b> Canine Babesiosis Nuran Aysul .....	74
<b>Salmonella patojenite adaları (1-10)</b> <i>Salmonella</i> pathogenicity islands (1-10) Elçin Günaydın, Selahattin Şen .....	79



## Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

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

2. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda; orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.

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

4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı [etikvetmikrobiyologdergi@gmail.com](mailto:etikvetmikrobiyologdergi@gmail.com) e-posta adresine gönderilmelidir.

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

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

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

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

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

**Anahtar kelimeler**, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.

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

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

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

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

**Teşekkür** bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

**Kaynaklar** bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile parantez içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kay-

nak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." (İngilizce metinlerde "et al.") kısaltması ile belirtilmelidir. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde belirtilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır; Süreli Yayın:

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

Yazarlı Kitap:

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

Editörlü Kitap:

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

Editörlü Kitapta Bölüm:

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

Kongre Bildirileri:

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

Tezler:

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

Anonim:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

## Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

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

4. Manuscript written in Microsoft Word format and figures in JPEG format at minimum 300 dpi resolution should be submitted to [etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com](mailto:etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com)

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

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

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

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

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

**Key Words** should be written in alphabetical order and should not exceed 5 words.

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

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

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

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

**Acknowledgements** must be indicated before references if necessary.

**References** should be listed alphabetically and chronologically by numbers. In the body of text, reference must be shown by author's surname and list number or only by list number within parenthesis. If there is more than one reference that refers to the same issue, these should be arranged by smallest to biggest reference list numbers at the end of sentence. If the reference is more than two

authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et al.". For the abbreviation of journals, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis. If the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as "a" and "b" in the list of references.

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

For articles:

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

For books:

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

For edited books:

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

For chapter in edited books:

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

For congress papers:

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

For dissertations:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Unpublished papers are not returned to their author.





## Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* infeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile teşhisi

Seyda CENGİZ<sup>1</sup>, Orkun BABACAN<sup>2</sup>, Gökçen DİNÇ<sup>3</sup>, Mehmet AKAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Geliş Tarihi / Received: 20.05.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 07.09.2011

**Özet:** *Mycoplasma gallisepticum* tavuklarda önemli ekonomik kayıplara neden olarak, vertikal ve horizontal yayılım gösterir. Bu etkenin teşhisi için pek çok metod kullanılmasına rağmen PCR temelli teşhis metodları ile izolasyona gerek kalmadan infeksiyon izlenebilir, yüksek duyarlılıkta hızlı sonuç alınabilir. İncelenen 26 kümesin 14 (%53,8)'ü *M.gallisepticum* yönünden pozitif bulundu. Materyal orijini dikkate alındığında 14 broyler kümeisten alınan trachea örneklerinin 28 adetinden pozitif sonuç alınırken bu kümelere ait tracheal svab örneklerinden sadece 5 (%19,2) küme ait olanlarda *M.gallisepticum* spesifik DNA varlığı saptandı. Bu bulgu özellikle örnekleme aşamasında mikoplazma infeksiyonu şüpheli kümeslerden hem trachea hem de svab örneklerinin alınmasının yararlı olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar PCR metodunun kullanılması ile *M.gallisepticum* infeksiyonlarının daha kısa sürede ve daha spesifik olarak teşhis edilebileceğini ve trachea örneklerinin tracheal svab örneklerine göre daha fazla pozitiflik sağladığını göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycoplasma gallisepticum*, PCR, Tavuk.

### Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens by polymerase chain reaction (PCR)

**Summary:** *Mycoplasma gallisepticum* causes important economic losses and it spreads vertically and horizontally in chickens. Although a lot of methods are used for detection of this bacterium, agents can be obtained and sensitive and rapid result can be achieved by PCR based diagnosis method regardless of isolation. In this study, trachea and tracheal swab samples collected from various broiler flocks were evaluated. 14 of 26 investigated flocks (%53,8) were found to be *M.gallisepticum* positive. 28 of all trachea samples from 14 flocks and tracheal swabs which were taken 5 (%19,2) flocks considered to be positive. This result showed that *M.gallisepticum* infections can be diagnosed rapidly and more specifically and more positive results can be achieved in tracheal organ samples than tracheal swabs.

**Key words:** Chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, PCR.

### Giriş

*Mycoplasma gallisepticum* tavuklarda solunum sistemi infeksiyonu ile seyreden klinik bulguların yanında, broylerde karkas ağırlığının düşmesine, yumurtacı hayvanlarda yumurta veriminin azalmasına neden olan, genç hayvanlarda hareket ve canlılığın kaybolması, artrit, tenosynovitis ile seyreden bir infeksiyondur (6, 11, 12).

Hayvanlarda konjunktivitis, öksürük, sinuslarda şişme, burun akıntısı, gözyaşı akıntısı gibi klinik bulgular ile seyreder. İnfeksiyon yumurta yolu ile vertikal bulaşma göstermesinin yanında, hayvanlar arasında temas yolu ile lateral bulaşma da meydana gelir. Newcastle, İnfeksiyöz Bronşitis gibi viral in-

feksiyonlar ya da *E.coli* gibi bakteriyel infeksiyonlar ile komplike olduğunda klinik bulgular ağırlaşır. Nekropside burun, trachea ve akciğerlerde mukus birikimi, hava keselerinde matlaşma, kalınlaşma görülür. Deneysel infeksiyonlarda 6-21 gün süren bir inkübasyon süresi bulunurken, doğal infeksiyonlarda hayvanın immun sistemi iyi ise hayvanlar herhangi bir stresle karşılaşınca kadar asemptomatik taşıyıcı olarak kalırlar (2, 4-6, 12).

İnfeksiyonun teşhisi için kültür ve seroloji yöntemlerinin yanında PCR temelli metodlar da kullanılmaktadır. Özellikle infeksiyonun vertikal yolla bulaşması bu etkenin erken dönemde teşhisini gerektirir. Bu amaçla kullanılan kültür ve serolojik metodlarda problemler görülebilmektedir. Etke-

nin kültüre edilmesi aşamasında kültür metodunun uzun sürmesi aynı zamanda kontaminasyon riskinin bulunması, serolojik testlerde ise hatalı negatif ya da pozitif sonuçların alınması, kros reaksiyonların olması enfeksiyonun teşhisi aşamasında PCR tabanlı teşhis metodlarını daha kullanışlı hale getirmektedir. (1, 5, 8, 13, 15).

PCR temelli teşhis metodlarının kullanımı ile etken izolasyonuna gerek kalmadan etkenin izlenmesi, yüksek duyarlılık ve hızlı teşhis ile sonucun alınması sağlanır. Kanatlı endüstrisinde avian patojenik mikoplazmaların birden fazla türde olmaları ve bazı durumlarda miks enfeksiyon oluşturmaları PCR amplifikasyonu gibi yöntemlerin uygulanmasını önemli hale getirir (9, 11, 16).

Hastalığın teşhisi için enfeksiyonun görüldüğü hayvanlardan doku ve organlar alınırken, solunum yolu eksudatlarından da svab örnekleme yapılmaktadır. Örnekler canlı hayvanlardan alınabileceği gibi yeni ölmüş hayvanlardan ya da öldükten sonra hemen dondurulmuş hayvanlardan alınmaktadır. Farinks, kloaka, trachea, sinus ve özefagusdan svab örnekleme yapılabilir (5, 12, 15, 18).

PCR için en sık kullanılan örnekleme metodu ise tracheal svab örneklemesidir. Bunun için örnekler alındıktan sonra buzdolabında saklanarak DNA lizisi engellenmelidir (16).

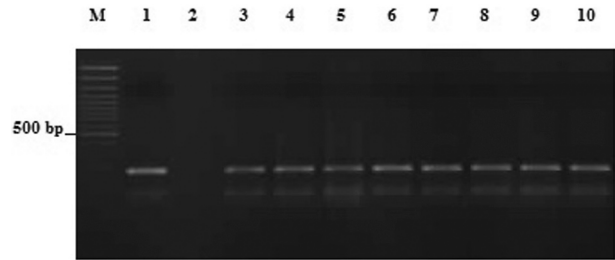
Bu çalışmada broyler kümeslerinden alınan trachea ve tracheal svab örneklerinde PCR metodu ile *M.gallisepticum* varlığı araştırıldı.

## Materyal ve Metot

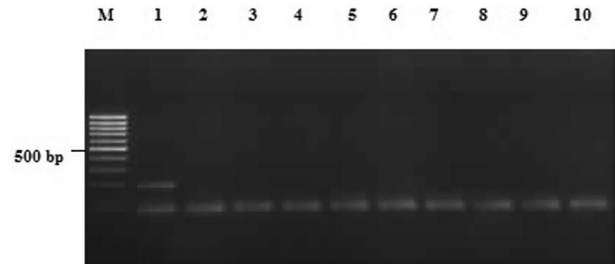
Bu çalışmada Bolu-Adapazarı illerindeki kesim aşamasına (40-45 günlük) gelmiş solunum sistemi problemi olan 26 adet broyler kümesinden 52 trachea örneği ve 141 adet transport mediumsuz tracheal svab örneği alındı. Kümeden alınan iki adet tracheal örneği bir materyal olarak değerlendirildi. Aynı şekilde her kümeden alınan tracheal svab örnekleri de birleştirilerek incelendi. Materyaller, OIE'nin *M.gallisepticum* için hazırladığı DNA ekstraksiyon metodu ve PCR protokolüne göre incelendi (14). Kontrol suşu olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlanan *M.gallisepticum* suşu kullanıldı. PCR işlemi sonucunda 185 bp büyüklüğünde bandların görülmesi, materyalde *M.gallisepticum* varlığını gösterdi.

## Bulgular

Çalışma kapsamında alınan 26 kümesin trachea örneklerinden 14 (%53.8) küme ait olan materyallerde spesifik bandlar saptanırken (Şekil 1), tracheal svab örneklerinde ise yalnızca 5 (%19.2) küme ait materyallerde *M.gallisepticum* yönünden pozitiflik bulundu (Şekil 2). Bu bulgu, tavuklarda *M.gallisepticum* enfeksiyonlarının saptanmasında tracheal örneklerin svab örneklerine göre daha uygun olduğunu gösterdi.



Şekil.1. Tracheal örneklerde *M.gallisepticum* araştırılmasında PCR işlemi sonucunda jel elektroforezde örnek görüntü M: Marker (100 bp Fermentase), 1: Pozitif Kontrol, 2: Negatif Kontrol, 3-10: Trachea Örnekleri.



Şekil.2. Tracheal svab örneklerinde *M.gallisepticum* araştırılmasında PCR işlemi sonucunda jel elektroforezde örnek görüntü M: Marker (100 bp Fermentase) 1: Pozitif Kontrol, 2: Negatif Kontrol, 3-10: Tracheal Svab Örnekleri.

## Tartışma ve Sonuç

Mikoplazma enfeksiyonları kanatlı hayvanlarda verim düşüklüğünün yanında vertikal yolla bulaşma göstermesi nedeniyle eradikasyon gerektiren bir problemdir. Bu enfeksiyonun en kısa sürede tespit edilmesi sürü bazında yetiştiriciliğin yapıldığı tavukçuluk sektöründe oldukça önemlidir. Bu amaçla kültür ve serolojik taramaların uzun süre alması, serolojik taramalarda hatalı sonuçların alınması gibi problemleri ortadan kaldırmak ve kısa sürede daha spesifik sonuçların alınmasını sağlamak amacıyla PCR tabanlı teşhis metodları kullanılmaktadır.

*M.gallisepticum* infeksiyonunun teşhisinde PCR metodunu kullanarak yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir.

Ürdün'de Gharabeh ve Roussan tarafından yapılan çalışmada, araştırmacılar, 76 ticari broyler kümesinden yapılan örneklemede 24 adet *M.gallisepticum* izolatu elde etmişlerdir (9).

Roussan ve ark. (17), 115 küme de yaptıkları MG taramasında PCR ile 25 kümesinde infeksiyon belirlemişlerdir. Benbahan ve ark. (4), ise PCR tekniğinin kullanarak 100 trachea örneğini MG yönünden değerlendirmişler ve 55 adet örnekte pozitiflik saptamışlardır. Buim ve ark. (5), 33 ticari kanatlı çiftliğinden topladıkları 1046 örnekte Multiplex PCR metodu ile 21 adet hayvanda *M.gallisepticum* için pozitiflik belirlerken, 36 adet hayvanda *M.gallisepticum* F suşu bulmuşlar, 33 çiftlikten 4 adedinde sürü pozitifliğine rastlamışlardır. Evans ve ark. (7), Mikoplazma infeksiyonunun teşhisi için yaptıkları kültür ve PCR teşhis yönteminde kültür ile 30 örnekte 14 adet pozitiflik bulurken, PCR ile 11 adet pozitiflik belirlemişlerdir. Bağcıgil (3), 96 adet tavukta *M.gallisepticum* için yaptığı PCR teşhisinde 47 adet hayvana ait trachea örneğinde etken spesifik DNA bildirmiş, etkenin kültüre edilmesinin uzun zaman alması nedeniyle PCR metodunun kısa sürede ve spesifik sonuç vermesi bakımından güvenilir olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç da PCR temelli moleküler tekniklerin MG şüpheli kümeslerde hızlı ve kullanışlı bir teşhis metodu olduğunu göstermektedir.

Levisohn ve Kleven (14), özellikle antibiyotik kullanım durumlarında kültür ile tespit edilemeyen etkenlerin moleküler teşhis metodları ile kolaylıkla saptanabileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar moleküler metodların özellikle kontaminasyon ya da sekonder bakteriyel infeksiyonların varlığında değerinin daha fazla arttığını da bildirmişlerdir. Kâhya ve ark. (10), yaptıkları realtime PCR işleminde ise 646 tracheal svab örneğinde 73 adet pozitiflik saptamışlar ve bu metodun tavuk kümeslerindeki MG infeksiyonlarının teşhisinde kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da 26 kümeden alınan toplam 52 trachea örneğinde 14 (%53,8) küme ait pozitiflik bulunurken, 141 tracheal svab örneğinde 5 (%19,2) küme ait örneklerde pozitiflik bulundu. Bu bulgular araştırmacıların moleküler bulguları ile paralellik göstermektedir.

Svab örnekleme için Zain ve ark. (18), tarafından yapılan çalışmada kuru ve ıslak svablar ile tracheal örnekleme yapılarak, *M.gallisepticum*'a PCR ile bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ıslak svablarla yapılan örneklemede pozitif bulunan örnek sayısı, kuru svablarla yapılan örneklemedeki pozitiflikten daha fazla bulunmuştur. *M.gallisepticum*'un kuru svablarda hayatta kalma süresinin oda ısısında veya +4°C'de 24 saatten daha kısa olduğu, ıslak svablarda ise bu sürenin en az 24 saat olduğu belirlenmiştir.

Levisohn ve Kleven (14), ise trachea örnekleme için *M.gallisepticum*'un teşhisinde diğer organlara göre daha sık tercih edilen örnekleme olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar özellikle infeksiyonun akut fazında *M.gallisepticum*'un en yüksek seviyede olduğunu, humoral veya lokal bağışıklık durumlarında da infeksiyonun persiste halde tracheada belirlenebildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada yapılan örneklemede ise trachea ile tracheal svab örnekleme karşılaştırılmış ve trachea örneklerindeki pozitifliğin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu bulgu trachea örneklerinin *M.gallisepticum*'un teşhisinde uygun bir materyal olduğu bulguları ile uyumludur.

Sonuç olarak yapılan değerlendirmelerde, PCR metodunun kullanılması ile *M.gallisepticum* infeksiyonlarının daha kısa sürede ve daha spesifik olarak teşhis edilebileceğini, tavuklarda *M.gallisepticum* infeksiyonlarının PCR ile teşhisinde tracheal örneklerin tracheal svab örneklerine göre daha uygun bir materyal olduğu belirlendi.

## Kaynaklar

1. Anonim, (2008). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum, M. Synoviae) in OIE Terrestrial Manual Online*. Chapter. 2.3.5. p. 482-496. Erişim adresi: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.05\\_%20AVIAN\\_MYCO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf), Erişim tarihi: 25.04.2011.
2. Anonim, (2007). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum), Pleuropneumonia-like Organism (PPLo) Infection, Chronic Respiratory Disease, Infectious Sinusitis, House Finch Conjunctivitis*. Erişim adresi: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/avian\\_mycoplasmosis\\_mycoplasma\\_gallisepticum.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/avian_mycoplasmosis_mycoplasma_gallisepticum.pdf), Erişim tarihi: 20.04.2011.
3. Bağcıgil F, (2002). *Tavuklarda mycoplasma gallisepticum infeksiyonunun tanısında bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerin polymerase chain reaction (PCR) ile karşılaştırılması*. Doktora Tezi. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. İstanbul.

4. **Behbahan GG, Asasi K, Afsharifar AR, Poubakhsh SA,** (2005). *Isolation and detection of Mycoplasma gallisepticum by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.* Iranian J Vet Res Uni Shiraz. 6, 35-41.
5. **Buim MR, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJP,** (2009). *Epidemiological survey on Mycoplasma gallisepticum and M.synoviae by Multiplex PCR in commercial poultry.* Pesq Vet Bras. 29, 552-556.
6. **Esendal Ö,** (2002). *Mikoplazma İnfeksiyonları. Kanatlı Hayvan Hastalıkları.* Edt: İzgür M, Akan M. Medisan, Ankara.p.79-85.
7. **Evans JD, Thornton DL, Branton SL,** (2009). *Diagnosis of Mycoplasma gallisepticum from broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostic Methods.* Int J Poult Sci. 8, 104-107.
8. **Feberwee A, Mekkes DR, Wit JJ, Hartman EG, Pijpers A,** (2005). *Comparison of Culture, PCR and Different Serologic Tests for Detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae Infections.* Avian Dis. 49, 260-268.
9. **Gharaibeh S, Roussan D,** (2008). *The Use of Molecular Techniques in Isolation and Characterization of Mycoplasma gallisepticum from Commercial Chickens in Jordan.* Int Poult Sci. 7, 28-35.
10. **Kahya S, Temelli S, Eyigör A, Çarlı KT,** (2010). *Real-Time PCR culture and serology for diagnosis of Mycoplasma gallisepticum in chicken breeder flocks.* Vet Microbiol. 144, 319-324.
11. **Khan MI,** (2003). *Multiplex PCR of Avian Pathogenic Mycoplasmas. Methods in Molecular Biology.* Edt: Sachse K, Frey J. 216, 223-229.
12. **Kleven SH, Jordan FTW, Bradbury JM,** (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Avian Mycoplasmosis.* Fifth edition. Paris: Office International des Epizooties, Chapter 2.7.3. p.1-24.
13. **Levisohn S,** (2000). *Avian Mycoplasmosis Biotechnology Applied in Peru.* Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan Israel.
14. **Levisohn S, Kleven SH,** (2000). *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum).* Rev Sci Tech Off Epiz. 19, 425-442.
15. **Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I,** (2002). *Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycoplasma gallisepticum in enviromental samples.* Avian Pathol. 31, 163-168.
16. **Moalic P,** (2002). *Improving mycoplasmosis control using PCR technology.* World Poult. 18, 38-39.
17. **Roussan D.A, Haddad R, Khawaldeh G,** (2008). *Molecular Survey of Avian Respiratory Pathogens in Commercial Broiler Chicken Flocks with Respiratory Disease in Jordan.* Poult Sci. 87, 444-448.
18. **Zain ZM, Bradbury JM,** (1996). *Optimising the conditions for isolation of Mycolasma gallisepticum collected on applicator swabs.* Vet Microbiol. 49, 45-57.

## Phylogenetic relationships of three bat species from Turkey

İrfan ALBAYRAK<sup>1</sup>, Hikmet ÜN<sup>2</sup>, Nursel AŞAN<sup>1</sup>, Nil ÜNAL<sup>2</sup>, Thomas MÜLLER<sup>3</sup>,  
Conrad FREULING<sup>3</sup>, Orhan AYLAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup>Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Etlik, Keçioren, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Institute of Epidemiology, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research, Friedrich-Loeffler-Institute, Wusterhausen, Germany

Geliş Tarihi / Received: 07.06.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 23.11.2011

**Summary:** The applicability of DNA sequencing of the Cytochrome b (encoded by mitochondrial DNA) gene was tested for species delineation and species identification in three bat species (*Miniopterus schreibersii*, *Myotis blythii* and *Myotis myotis*) sampled from Turkey as a geographic region. Morphologically identified species have also identified genetically. This study showed that DNA markers are valuable molecular methods for biodiversity monitoring programs in Turkey. Sequencing-based comparisons could provide more flexibility in large-scale studies for Turkish bat species.

**Key words:** Bats in Turkey, Cytochrome b, molecular differentiation, phylogenetic analyses, species identification.

### Türkiye’de bulunan üç yarasa türü arasındaki filogenetik ilişkiler

**Özet:** Türkiye’nin farklı iki ilinden örneklenen üç yarasa türünün (*Miniopterus schreibersii*, *Myotis blythii* and *Myotis myotis*) tarif ve tanımlanmasında mitokondrial Cytochrome b geninin kullanılabilirliği test edildi. Morfolojik olarak tanımlanmış olan türler genetik olarak da tanımlandı. Bu çalışma, Türkiye’de biyolojik çeşitliliğin izlenmesi programlarında DNA işaretleyicilerin, değerlendirilebilir moleküler metotlar olduğunu gösterdi. Dizin analizi tabanlı karşılaştırmaların, Türk yarasa türleri ile yapılacak geniş ölçekli çalışmalarda daha fazla esneklik sağlayabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Türkiye’de yarasalar, Cytochrome b, moleküler ayırma, filogenetik analiz, tür tanımlama.

### Introduction

Up to now, 38 bat species have been recorded by various authors from Turkey (8, 26, 10). Of the 38 Turkish bats, one feeds on fruit while the others feed insects (10).

These species show variation with respect to their ecological, biological, karyological and molecular properties (1-3, 6, 7, 9, 13, 20). Morphological keys are available to assist the species identification allowing for the majority of species to be identified from external and cranial characters (1, 2, 15). However, molecular studies are also reliable and rapid tools for identifying even morphologically very similar species (23). Recently, molecular studies have enabled the determination of some specimens that were previously unconfirmed, as a new species (11, 14, 20-25).

Mitochondrial DNA (mtDNA) has long been treated as an ideal marker because of its convenience for reconstruction of gene genealogy and population history inference (16).

In this study, we tested the applicability of DNA sequencing of the Cytochrome b (encoded by mitochondrial DNA) gene for species delineation and species identification in three bat species sampled from Turkey. Cytochrome b gene is commonly used for species identification studies and phylogenetic analysis as a DNA marker (18, 19). This study is only a preliminary study for our future expectations and the sequence divergence estimation for Turkish bat species. We have just chosen three different species and analyzed cytochrome b gene of this species to show this study is feasible or not.

## Materials and Methods

**Sample collection and preparation:** Different places visited to collect samples around Turkey (Fig. 1). A 3 mm biopsy from the wing membrane, blood and swab samples were taken from bats. A total of 55 specimens were collected from 9 different bat species but only three of them were used for in this study (Table 1). The species were *Miniopter-*

*us schreibersii*, *Myotis blythii* and *Myotis myotis*. *M. schreibersii* (Y7) sampled from Trabzon and *M. blythii* (Y17) and *M. myotis* (Y31) sampled from Balıkesir. Fieldworks were undertaken to avoid disturbing the colonies. Biopsy of specimens was applied as described by Worthington and Barratt (28). The 3 mm holes in wings are known to knit in four or five weeks.



**Figure 1.** The number of samples according to provinces.

**Table 1.** Samples collecting localities, their sizes and coordinates.

Province	The Number of Samples	Decimal Coordinates	
		LAT.	LONG.
Trabzon	4	40,980000	39,770000
Gümüşhane	7	40,450000	39,430000
Balıkesir	17	39,650000	27,870000
Ankara	8	39,950000	32,850000
Kırıkkale	11	39,870000	33,620000
Hatay	1	36,220000	36,150000
Adana	7	37,000000	35,330000

### Morphological criteria for species identification:

Identification of bat species is achieved by using external, cranial measurements and baculum structure (1, 2, 4, 6, 15). Morphologically, three species were identified as *M. myotis*, *M. blythii* and *M. schreibersii*. Y31, Y17 and Y7 code numbers were given to each species, respectively.

**Nucleic Acid Preparation:** Total DNA was isolated from samples using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Germany), following the 'Purification of Total DNA from Animal Tissue' protocol. Briefly, samples were lysed overnight using proteinase K after which the lysate was loaded onto a DNA Mini spin column. The DNA was then selectively bound to the column membrane by centrifugation and stored in elution buffer of kit (-20°C).

**Sequence amplification:** Previously published primers were used (18). BarbF1 (5'-CCT CAA ATA TTT CAT CAT GAT G-3') and BarbR2 (5'-GTC CTC CAA TTC ATG TTA GG-3') primer pairs were used to amplify cytochrome b.

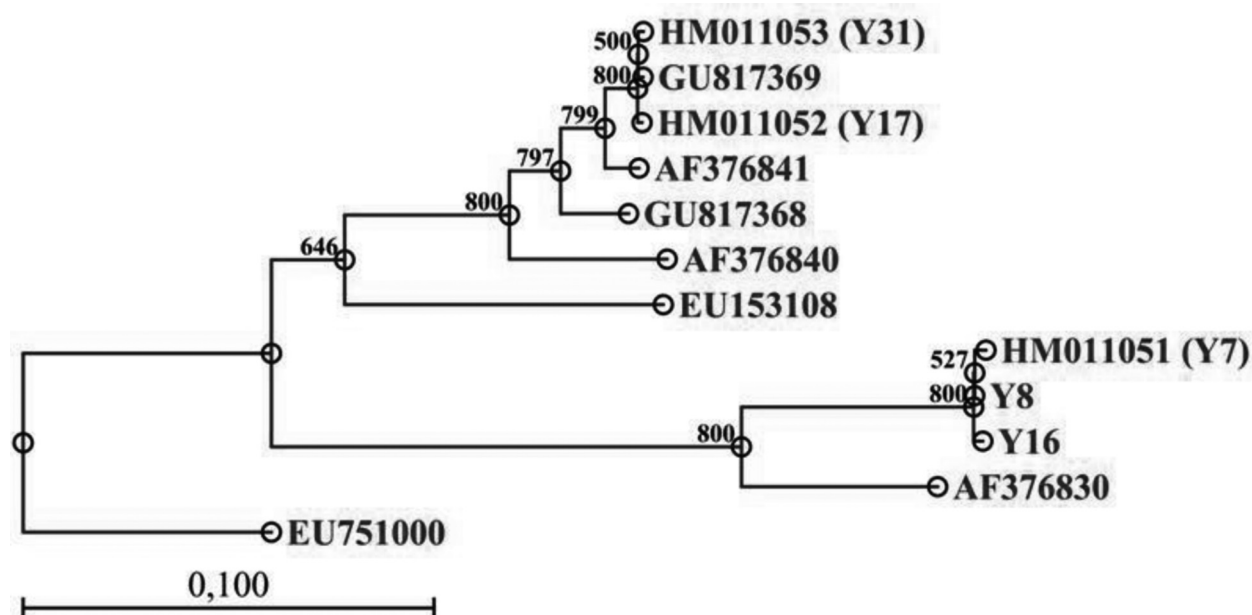
Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq was used for PCR amplification (Invitrogen, USA). PCR mastermixes were prepared according to manufacturer instructions as follows: 17,8 µl of HPLC H2O, 25 µl of 2XBuffer, 1 µl of forward primer (Barb F1) (0.2 µM), 1 µl of reverse primer (Barb R2) (0.2 µM) and 0.20 µl of Platinum

Taq DNA Polymerase (0.5 U/ml). Template DNA (5 µl at 100 ng/µl) was added to the aliquot (45 µl) of mastermix. Thermocycling conditions included an initial denaturation at 95°C (15 min), followed by 37 cycles at 94°C (50 s), 45.6-56.5°C (50 s) and 72°C (60 s) with a final 10 min extension at 72 °C using a PTC 100 machine (MJ Research, USA).

Amplified products were separated in a 1% agarose gel and visualised under ultraviolet illumination following ethidium bromide staining. All successfully amplified products were purified using the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Sequencing reactions on purified PCR products included primer pairs used for initial amplification (at 0.5 initial concentration), and the ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) was used according to the manufacturer's instruction. Sequenced products were cleaned with DyeEx 2.0 Nucleospin nucleotide removal kit

(Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Automated fluorescence sequencing was performed with an ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA).

**Sequence Analysis:** The sequences were edited and aligned using CLC Main Workbench software (22). Multiple sequence alignments were generated using CLC Main Workbench program (22). Cytochrome b gene haplotype consensus sequences were generated for each species (811 bases) covering the 142-952 base nucleotide region of the cytochrome b gene, with an out group (GenBank Accession number is EU751000) also aligned. Additional bat species sequences (GU817369, GU817368, EU153108, AF376830, AF376841, AF376840) were obtained from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) and used for comparison. Phylogenetic tree was built by Neighbor-Joining method (Fig. 2). Reliability of clades was checked with bootstrap analysis with 1000 replications (18).



**Figure 2.** Phylogenetic relationships of three different bat species. Y8 and Y16 are used for additional data. Bat species sequences (GU817369, GU817368, EU153108, AF376830, AF376841, AF376840) were obtained from NCBI and used for comparison.

## Findings

Cytochrome b sequences were obtained from three species, the sequence length 811 bases. These sequences have been deposited to GenBank with the accession numbers HM011051, HM011052

and HM011053. A sample of *Eptesicus serotinus* (EU751000) from Azerbaijan (27) was included in the analysis as an outgroup. The species consensus sequences (811bases) were built using nucleotide region of the cytochrome b gene. This consensus demonstrated that they aligned across 811 bases,

with no sites of insertion or deletion. The neighbor joining tree was generated and given in figure 2. Our analyses, based on the mitochondrial genes cytochrome b (a common species-level marker), suggest that this kind of markers are capable of discriminating bat species with high accuracy. Morphologically identified species have also identified genetically in this study.

## Discussion and Conclusion

Up to now, 38 bat species were recorded from Turkey (10). Predominantly, researchers from Turkey prefer morphological studies about bats and they published their findings. Morphological characterization of bat species should be applied as an essential protocol (5). But, identification of bat species using molecular tools will also be possible in conjunction with bat characterization of morphological features. Especially, samples are damaged or identification from morphological criteria is not possible or if the specimen is degraded or visual inspection is not possible or the morphological expertise is not available or large-scale studies are needed.

The rapid and accurate identification of species is a critical component of large-scale biodiversity monitoring programs (17). Substantial sequence divergence suggests an unexpected high number of undiscovered species (24).

The phylogenetic studies were done for two bat species by different research groups in recent years in Turkey. Only, *M.schreibersii*, *M.capaccinii* and *Plecotus kolombatovici* have been studied (12, 13, 20). Therefore we need more molecular works and comparative studies on all bat species.

Three different species were chosen and analyzed cytochrome b gene of this species to show for future expectation. Study showed that DNA markers are valuable molecular methods for biodiversity monitoring programs in Turkey. Therefore, sequencing-based comparisons could provide more flexibility in large-scale studies for Turkish bat species. Also, results gave us an idea about sequence divergence estimation in bat population in Turkey, because there is no completed similar study.

The cytochrome b gene sequences for the three Turkish bat species in this study were compared with sequences available from GenBank. All of the sequences are highly similar to those of published

specimens. The sequence similarity is ranging between 86% and 99%.

We present a framework for future characterization of the impact of sequence detection, morphological characterization and building a DNA library for Turkish bat species.

## Author's Contributions

HU carried out the fieldwork and molecular genetic studies, performed analyses and drafted the manuscript. IA coordinated the fieldwork and helped in drafting the manuscript. NA and NU helped drafting the manuscript. OA carried out the fieldwork, supervised the laboratory works and helped in drafting the manuscript. TM and CF helped in drafting manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We would like to thank Prof. Dr. A.R. Fooks for suggestion, Dr. Nahit Yazıcıoğlu for logistic supports and comments and Dr. Tarkan Yorulmaz for obtaining samples.

## References

1. **Albayrak İ**, (1990). *Doğu Anadolu yarasaları (Mammalia: Chiroptera) ve yayılışları*. Doğa Tr. J. Zool. 14, 214-228.
2. **Albayrak İ**, (1993). *Batı Anadolu yarasaları ve yayılışları (Mammalia: Chiroptera)*. Doğa Tr. J. Zool. 17, 237-257.
3. **Albayrak İ**, (2003). *The bats of the Eastern Black Sea Region in Turkey (Mammalia: Chiroptera)*. Turk J. Zool. 27, 269-273.
4. **Albayrak İ, Aşan N**, (1998). *Geographic variations and taxonomic status of Myotis myotis (Borkhausen, 1797) in Turkey (Chiroptera: Vespertilionidae)*. Turk. J. of Zoology. 22, 267-275.
5. **Albayrak İ, Aşan N**, (1999). *Distributional status of the bats from Turkey (Mammalia: Chiroptera)*. Commun. Ac. Sci. Univ. Ank. Series C. 17, 59-68.
6. **Albayrak İ, Aşan N**, (2001). *The Structure of baculum in Myotis myotis and Myotis blythii (Chiroptera: Vespertilionidae)*. Turk. J. of Zool. 25 (3), 229-233.
7. **Albayrak İ, Aşan N, Yorulmaz T**, (2008). *The natural history of the Egyptian fruit bat Rousettus aegyptiacus in Turkey (Mammalia: Chiroptera)*. Turk. J. of Zool. 32, 11-18.
8. **Amr ZS, Abu Baker MA, Qumsiyeh MB**, (2006). *Bat diversity and conservation in Jordan*. Turk J. Zool. 30, 235-244.
9. **Aşan N, Albayrak İ**, (2006). *A study on the breeding biology of some bat species in Turkey*. Turk. J. of Zool. 30, 103-110.

10. Benda P, Andreas M, Kock D, Lučan RK, Munclinger P, Nová P, Obuch J, Ochman K, Reiter A, Uhrin M, Winfurtová D, (2006). *Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part 4. Bat fauna of Syria: distribution, systematics, ecology*. Acta Soc. Zool. Bohem. 70, 1-329.
11. Berthier P, Excoffier L, Ruedi M, (2006). *Recurrent replacement of mtDNA and cryptic hybridization between two sibling bat species Myotis myotis and Myotis blythii*. Proc. Biol. Sci. 273 (1605), 3101-3109.
12. Bilgin R, Karataş A, Çoraman E, Pandurski I, Papadatou E, Morales JC, (2006). *Molecular taxonomy and phylogeography of Miniopterus schreibersii (Kuhl, 1817) (Chiroptera: Vespertilionidae), in the Eurasian Transition*. Biol J Linn Soc. 87, 577-582.
13. Bilgin R, Karataş A, Çoraman E, Morales JC, (2008). *The mitochondrial and nuclear genetic structure of Myotis capaccinii (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Eurasian transition, and its taxonomic implications*. Zool Scripta. 37 (3), 253-262.
14. Castella V, Ruedi M, Excoffier L, (2001). *Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat Myotis myotis*. J. Evol. Biol. 14, 708-721.
15. Dietz C, Helversen O Von, (2004). *Illustrated identification key to the bats of Europe*. Electronic Publication Version 1.0. <http://www.mammalwatching.com/Paleartic/Otherreports/batkey.pdf>, 36-72.
16. Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A, (2008). *The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome*. BMC Genomics. 9, 119.
17. Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, Hebert PDN, (2007). *Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring*. BMC Biol. 5, 24.
18. Harris SL, Johnson N, Brookes SM, Hutson AM, Fooks AR, Jones G, (2008). *The application of genetic markers for EBLV surveillance in European bat species*. Dev Biol. 131, 347-363.
19. Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC, (1991). *Evolution of cytochrome b gene in mammals*. J Mol Evol. 32, 128-144.
20. Juste J, Ibanez C, Munoz J, Trujillo D, Benda P, Karataş A, Ruedi M, (2004). *Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (Plecotus) in the Mediterranean Palae-arctic and Atlantic Islands*. Mol Phylogenet Evol. 31, 114-1126.
21. Kanuch P, Hajkova P, Rehak Z, Bryja J, (2007). *A rapid PCR-based test for species identification of two cryptic bats Pipistrellus pipistrellus and P. pygmaeus and its application on museum and dropping samples*. Acta Chir. 9(1), 277-282.
22. Knudsen B, Knudsen T, Flensburg M, Sandmann H, Heltzen M, Andersen A, Dickenson M, Bardram J, Steffensen PJ, Mønsted S, Lauritzen T, Forsberg R, Thanbichler A, Bendtsen JD, Görlitz L, Rasmussen J, Torstrup D, Værum M, Ravn MN, Hachenberg C, Fisker E, Dekker P, Schultz J, Hein AMK, Sinding JB, (2007). *CLC Main Workbench, Version 5.5*. CLC bio, Finlandsgade 10-12, Katrinebjerg, 8200 Aarhus N, Denmark.
23. Mayer F, Helversen O Von, (2001). *Cryptic diversity in European bats*. Proc. R. Soc. Lond. B 268, 1825-1832.
24. Mayer F, Dietz C, Kiefer A, (2007). *Molecular species identification boosts bat diversity*. Front in Zool. 4, 1-5.
25. Ruedi M, Mayer F, (2001). *Molecular systematics of bats of the genus Myotis (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences*. Mol Phyl and Evol. 21 (3), 436-448.
26. Spitzenberger F, Strelkov PP, Winkler H, Haring E, (2006). *A preliminary revision of the genus Plecotus (Chiroptera, Vespertilionidae) based on genetic and morphological results*. Zoologica Scripta. 35, 187-230.
27. Trujillo RG, Patton JC, Schlitter DA, Bickham JW, (2009). *Molecular phylogenetics of the bat genus Scotophilus (Chiroptera: Vespertilionidae): Perspectives from paternally and maternally inherited genomes*. J of Mam. 90(3), 548-560.
28. Worthington WJ, Barratt EM, (1996). *A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans*. Bat Res News. 37, 1-3.

## The investigation of prevalence, vancomycin resistance and slime factor production of enterococci isolated from chicken carcasses

Belgin SIRIKEN<sup>1</sup>, Arzu FINDIK<sup>2</sup>, Gökhan İNAT<sup>1</sup>, Özgür ÇADIRCI<sup>1</sup>, Tahsin Onur KEVENK<sup>1</sup>

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, <sup>1</sup>Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, <sup>2</sup> Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 08.07.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 23.11.2011

**Summary:** The aim of this study was to investigate the prevalence, vancomycin resistance and slime factor production of *Enterococcus* spp. in chicken carcasses consumed in Samsun province, north of the Turkey. For this purpose, 123 chicken carcasses were analyzed by direct culture technique on Slanetz and Bartley Medium and, a total of 92 *Enterococci* spp. were isolated from 41 (33.3%) out of the 123 samples and identified phenotypically. All enterococci isolates were confirmed at the genus level by a single PCR targeted tuf gene using *Enterococcus* specific primers. To identify these enterococci as either being *E.faecalis* or *E.faecium* and to detect vancomycin resistance, a multiplex PCR based on the amplification of ddl and van (van A, B, C1/2, D, E and G) genes were performed. While 39 (42.4%) and none of these isolates were identified as *E.faecalis* and *E.faecium*, respectively, and the remaining 53 isolates (57.6%) were identified as *Enterococcus* spp. except from *E.faecalis* and *E.faecium*. vanA, vanB, C1/2, vanD, vanE, vanG genes were not detected in any of the isolates by this multiplex PCR. To detect slime factor production, Congo Red Agar Method was used and slime factor production was not detected in any of the isolates. In conclusion, *E.faecalis* isolates from chicken carcasses in Samsun Province of Turkey do not constitute a potential risk to the public health for vancomycin resistance and slime factor production.

**Key words:** Chicken carcass, Enterococci, PCR, slime factor production, vancomycin resistance.

### Tavuk karkaslarında *Enterococcus* spp. prevalansı ile vankomisin dirençliliği ve slime faktör üretme yeteneklerinin araştırılması

**Özet:** Bu çalışma, Samsun İli'nde tüketime sunulan tavuk karkaslarındaki *Enterococcus* spp.'nin prevalansı, vankomisin dirençliliği ve slime faktör oluşturma yeteneklerini belirlemek amacıyla yapıldı. Bu amaçla, Slanetz ve Bartley besiyerinde direkt kültür tekniği ile 123 adet tavuk karkası analiz edildi. Bu örneklerin 41'inden (%33.3) izole edilen toplam 92 adet suş fenotipik olarak *Enterococcus* spp. olarak tanımlandı. Tüm *Enterococcus* spp. izolatları, tuf genini hedefleyen PCR ile cins düzeyinde doğrulandı. Bu izolatların *E.faecalis* veya *E.faecium* olup olmadığını ve vankomisin dirençliliklerini belirlemek üzere, ddl ve van (van A, B, C1/2, D, E ve G) genlerinin amplifikasyonuna dayalı multiplex PCR gerçekleştirildi. Suşlardan 39 (%42.4) adedi *E.faecalis* olarak doğrulanırken, hiç bir suş *E.faecium* olarak tanımlanmadı. Geri kalan 53 (%57.6) izolat ise *E.faecalis* ve *E.faecium* dışındaki Enterokok türleri olarak değerlendirildi. van A, B, C1/2, D, E ve G genleri, hiçbir izolatta belirlenmedi. Slime faktör üretimini belirlemek üzere Kongo Kırmızısı içeren Agar yöntemi kullanıldı ve hiçbir izolatta slime faktör üretimi belirlenmedi. Sonuç olarak, Samsun İli'nde tavuk karkaslarından izole edilen *E.faecalis* izolatlarının, vankomisin dirençliliği ve slime factor oluşturmaları yönünden halk sağlığı için potansiyel bir risk oluşturmadığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Enterokok, slime factor üretimi, PCR, tavuk karkası, vankomisin direnci.

### Introduction

Enterococci are Gram-positive, facultative anaerobic bacteria that live as part of the natural flora in the intestinal tract of animals as well as humans (15). Therefore, for a long time, enterococci were considered to be unimportant from the medical point of view and also for food industry, but later the bacteria have emerged as important nosocomial

pathogens of concern, causing a variety of infections. Therefore, the enterococci are not regarded as primary pathogens but due to their ability to acquire high-level resistance to multiple antibiotics including aminoglycosides, ampicillin, tetracyclines, macrolides, chloramphenicol and vancomycin they have emerged as nosocomial pathogens worldwide. Among the antibiotic resistances, vancomycin resistance is of particular concern because of treat-

ment difficulties and the potential for this plasmid-mediated resistance trait to be transferred to other microorganisms. Of the 24 enterococcal species identified up to now, especially *E.faecalis* (85-90% of isolates) and *E.faecium* (5-10% of isolates) are the most important ones for nosocomial infections in humans (15) and the most prevalent species in foods (6, 14, 17).

Due to the heavy use of growth-promoting drugs in food animals, the antibiotic resistance in enterococci of animal origin has increased and also resistant enterococci have spread in the human population (5). This resistance can be both intrinsic that present in almost all the strains of enterococci or acquired. Cross resistances exist in related antibiotics therapeutically used in human or animal medicine such as avoparcin (similar to vancomycin, teicoplanin), virginiamycin (similar to quinupristin/dalfopristin), spiramycin, tylocin (similar to erythromycin) and avilamycin (similar to evernimisin) (23). Vancomycin, a glycopeptide antimicrobial agent has been used to treat Gram positive infections in humans. Up to date six glycopeptide resistance phenotypes; VanA, VanB, VanC, VanD, VanE and VanG, have been described in enterococci. It has been reported that they could be distinguished on the basis of the level, inducibility, and transferability of resistance to vancomycin and teicoplanin as well as associated resistance genes such as vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, and vanG (23). Generally, the vancomycin resistance is related to inhibition of cell wall synthesis by binding to peptidoglycan precursor and inhibition of following transglycosylation modified target of glycopeptide. The vanA genotype is the clinically most important one and widespread in enterococci. VanA resistance has been characterized as high-level, inducible and transferable. The second important genotype is vanB (23). The vanB resistance is inducible low-level vancomycin resistance. VanA resistance is usually plasmid borne but is now known to be encoded on a transposon (Tn1546) that may pass to the chromosome. VanB resistance is usually chromosomal and is occasionally transferable from chromosome to chromosome on a transposon (29). Both VanA and VanB resistance are seen most commonly in *E.faecium* and *E.faecalis*. VanD, VanE, and VanG have been reported to detect in single isolates of *E.faecium* and *E.faecalis*, respectively, until now. A constitutive low-level vancomycin resistance type, vanC geno-

type has been seen in some *E.gallinarum* strains (26). In the late 1980s, vancomycin-resistant enterococci (VRE) were first detected in humans as specific pathogens (35). Later, molecular evidences have indicated that in Europe and other countries around the world, food-producing animals are the likely reservoir of one type of VRE, namely *Enterococcus faecium* strains with the vanA antibiotic-resistance gene (25, 27, 38). This case could be associated with the use of the vancomycin-related glycopeptide (vancomycin and teicoplanin), avoparcin (an analogue of the glycopeptides) as prophylactic or growth promoter in animal production (2, 38). The ability of VRE to transmit to humans via the food chain have led to the decision of banning avoparcin in the European Union since 1997 (38) and Turkey since 1999 (1). Decreases in the prevalence of VRE in animals, meat products and humans have been observed after a relatively short period of time from the banning of avoparcin use in several European countries (10, 22).

Slime factor variously termed as biofilm, capsule or glycocalyx is an extracellular polymeric substance (EPS) produced by the some microorganism and play an important role in the attachment and colonization of organ or food-contact surfaces (24). The EPS also supports cell to cell bacterial contacts by means of a multilayered biofilm. Essentially, biofilm formation is a dynamic process and different mechanisms are involved in their attachment and growth. Bacteria in biofilms are generally more resistant to environmental stresses than their free-living bacteria. Therefore, EPS appear to be significant virulence factors for some bacteria such as enterococci. Like other Gram-positive microorganisms, enterococci are able to produce biofilms on abiotic surfaces and increasing their high innate resistance to antibiotics. The initial step in the colonization of surface and biofilm formation is bacterial adherence to the biomaterial. It has been reported that biofilm formation ability of enterococci is highly and significantly associated with the presence of esp gene (32).

The widespread and indiscriminate use of antibiotics in human and veterinary medicine and in livestock breeding has lead to a spread of antibiotic resistance (AR) among both pathogenic and commensal microorganisms. The same AR genes have been also isolated from human and food strains. Therefore, antimicrobial resistance constitutes

a major threat to public health in many countries due to the persistent circulation of resistant bacteria in the environment and the possible contamination of water and food such as poultry meats (30). Biofilm production has been also reported in some enterococcal infections. However, there are limited reports about the prevalence of vancomycin resistance and biofilm production of enterococci isolated from poultry in Turkey.

Therefore, the aim of this study was to investigate the occurrence, vancomycin resistance and slime factor production of *Enterococcus* spp. namely clinically important species, *E. faecalis* and *E. faecium*, in chicken carcasses consumed in Samsun province, Turkey.

## Materials and Methods

**Sample collection:** A total of 123 chicken carcasses were collected from different markets and butcher shops in the Samsun Province in North of the Turkey, between 2008 and 2009. These samples were analyzed immediately after procurement.

### **Enterococcus spp. isolation and identification:**

For the isolation, the whole carcass was transferred into a sterile polyethylene stomacher bag and rinsed with 225 ml 0.1% (wt/vol) of peptone water (Bacteriological peptone, Oxoid, Basingstoke, England) for 1-2 min (rinse method). Following, the carcass was removed aseptically and the remaining rinsate in the bag was cultured for microbiological analysis after 10-fold serial dilutions (up to 10<sup>-5</sup>) for each sample in sterile peptone water (PW). Subsequently, each of these dilutions was inoculated onto Slanetz and Bartley Medium (Oxoid CM 377) by spread plating technique (100 µl) and, the plates were incubated aerobically at 37°C for 24-48 h. (31). *Enterococcus* spp. colonies (bright red coloured colonies or pale colonies with bright red coloured centre) were selected and subcultured onto Triptone Soy Agar (CM 131, Basingstoke, England) plates to identify the isolates at the genus level using biochemical tests (10).

**DNA extraction:** In this study, the DNAs used for PCR analysis were extracted using boiling method.

**Table 1.** The oligonucleotide primers used in the study

Target gene	Primer names		Oligonucleotide sequences		Amplicon size (bp)
<i>ddl</i>	DD13	F	5'-CACCTGAAGAAACAGGC-3'	<i>E. faecalis</i>	476
	DD3-2	R	5'-ATGGCTACTTCAATTTACAG-3'		
<i>ddl</i>	FAC1-1	F	5'-GAGTAAATCACTGAACG-3'	<i>E. faecium</i>	1091
	FAC2-1	R	5'-CGCTGATGGTATCGATTCAT-3'		
<i>tuf</i>	ENT1	F	5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3'	<i>Enterococcus</i> spp.	112
	ENT2	R	5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3'		
<i>vanA</i>	EA1	F	5'-GGGAAAACGACAATTGC -3'	VAN A	732
	EA2	R	5'-GTACAATGCGGCCGTTA -3'		
<i>vanB</i>	EB3	F	5'-ACGGAATGGGAAGCCGA -3'	VAN B	647
	EB4	R	5'-TGCACCCGATTTCGTTT -3'		
<i>vanC1/2</i>	EC5	F	5'-ATGGATTGGTAYTKGTAT-3'*	VAN C	815/827
	EC8	R	5'-TAGCGGGAGTGMCYMGTA -3'*		
<i>vanD</i>	ED1	F	5'-TGTGGGATGCGATATTCAA -3'	VAN D	500
	ED2	R	5'-TGCAGCCAAGTATCCGGTAA -3'		
<i>vanE</i>	EE1	F	5'-TGTGGTATCGGAGCTGCAG -3'	VAN E	430
	EE2	R	5'-ATAGTTTAGCTGGTAAC -3'		
<i>vanG</i>	EG1	F	5'-CGGCATCCGCTGTTTTTGA -3'	VAN G	941
	EG2	R	5'-GAACGATAGACCAATGCCTT -3'		

### Confirmation of the *Enterococcus* spp. by PCR

**analysis:** For determination of *Enterococcus* spp. at genus level, extracted DNA was PCR-amplified using primers that target the *tuf* gene (elongation factor EF-Tu). For this purpose, Ent1 and Ent2 primers were used and amplification procedures were performed according to (20) (Table 1). *E.faecalis* ATCC 29212 and *S.aureus* ATCC 29213 were used as positive and negative control strains, respectively.

### Species specific identification and determination of vancomycin resistance by multiplex PCR

**analysis:** A multiplex PCR was performed to identify *E.faecium* and *E.faecalis* and detect the presence of van genes in these species. The primers for the amplification of species-specific D-Ala:D-Ala ligase genes (*ddl* genes) and van genes (*vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* and *vanG*) are presented in Table 1. These primers were selected and amplification was conducted as described by Depardieu et al. (9), after amplification, the DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet (UV) light. *E.faecalis* ATCC 29212 and *E.faecium* ATCC 19434 were used as control strains.

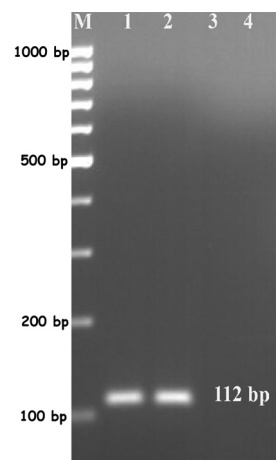
**Slime production:** Slime production assay was performed by cultivation of *Enterococcus* spp. isolates on Congo Red agar (CRA) plates containing 0.8 g/l of Congo red dye and 50 g/l of saccharose (16). Isolates were streaked on the CRA plates and incubated at 37°C for 24-48 hrs. Slime production was evaluated observing the rough black (slime positive) or red (slime negative) colonies on CRA.

## Results

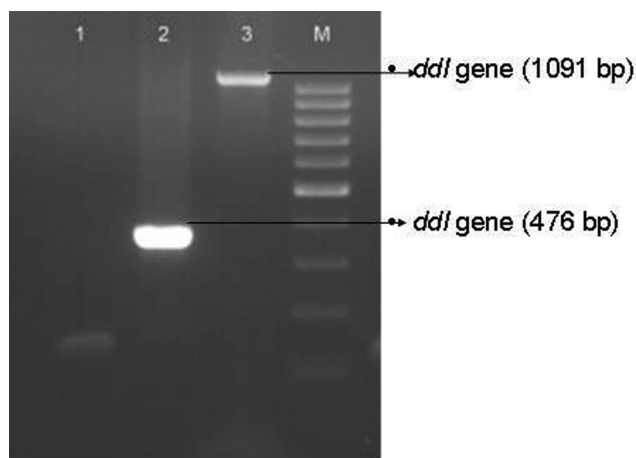
In the present study, a total of 92 *Enterococcus* spp. were isolated from 41 (33.3%) out of the 123 samples by direct culture on Slanetz and Bartley agar and verified by single PCR targeted *tuf* gene (Figure 1). Specificity was confirmed on positive and negative control strains. As expected, no band was observed for the negative control strain (*S.aureus* ATCC 29213) but the expected size of PCR products (476 bp) was observed for the positive control strain (*E.faecalis* ATCC 29212).

In multiplex PCR performed to identify enterococci either being *E.faecalis* or *E.faecium* and to detect vancomycin resistance, the *ddl* gene specific for *E.faecalis* was detected in thirty-nine of 92 iso-

lates (42.3%) and they were identified as *E.faecalis*, but no band was found specific for *E.faecium* (Figure 2). The remaining isolates (57.6%) were evaluated as *Enterococcus* spp. except from *E.faecalis* and *E.faecium*. *vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE*, *vanG* genes were also not detected in any of the isolates. None of the isolates was found slime positive on CRA.



**Figure 1.** The single PCR results targeted *tuf* gene for the detection of *Enterococcus* species **M:** Marker; **lanes 1-2:** *Enterococcus* species isolated from chicken carcasses



**Figure 2.** The multiplex PCR results targeted *ddl* genes for the detection *E.faecalis* and *E.faecium* and *vanA,B,C1/2,D,E* and *G* for the detection vancomycin resistant *Enterococcus* species **M:** Marker; **lane 2:** *ddl* gene (476 bp) for the detection of *E.faecalis* ATCC 29212; **lane 3:** *ddl* gene (1091 bp) for the detection of *E.faecium* ATCC 19434

## Discussion

Enterococci have been considered as low pathogenic bacteria that infect persons with special predispositions such as immunocompromised patients. However they have been reported to be able to cause different infections, even life-threatening infections such as bacteremia or endocarditis. The *Enterococcus* genus comprises more than 20 species and *E.faecalis* and *E.faecium* are the most common species in foods (6, 14, 17, 23). Similarly in several studies, different predominances of *Enterococcus* species, especially *E.faecalis* and *E.faecium* isolated from various poultry sources have been reported. Similar to later reports, in the present study, *Enterococcus* spp. was isolated from 33.3% of chicken carcasses and *E.faecalis* was found as the most prevalent species (42.3%). However *E.faecium* did not detected in any of the samples. The remaining isolates (57.6%) were evaluated as *Enterococcus* spp. except from *E.faecalis* and *E.faecium*. These differences in the predominance of *E.faecalis* and *E.faecium* in the poultry sources from the different areas in the world could be due to several factors such as geographic area, numbers of the analyzed sample and isolation methods.

It has been reported that enterococci including also the isolates from foods had a broad spectrum of natural or acquired antibiotic resistance. Two prerequisites for acquired antibiotic resistance are 1) the genetic potential by bacteria (mutations or acquisition of resistance genes from donor cells) and 2) the antibiotic selective pressure. Vancomycin, a glycopeptide antibiotic, is an important alternative for treatment of infections caused by multiple resistant enterococci as well as other Gram positive bacteria. The acquisition of resistance against this antibiotic and other glycopeptides results in dramatical decrease of the therapeutic possibilities in enterococcal infections. Thus, when considered in the medical point of view, acquired resistance against glycopeptides has a special concern (23).

Vancomycin resistant enterococci (VRE) had been first reported in UK by Uttley et al. (33), in Turkey, the first VRE isolation had been reported by Vural et al. (36), in Antalya province. Following the first isolation of VRE outside the healthcare settings, from sewage treatment plants in 1993 (4), VRE has been isolated from livestock feces and uncooked chicken samples purchased from retail outlets (5).

VRE have also recovered from manure samples from pig and poultry farms in Germany (21) and (11) have found VRE in the feces or intestines of other farm animals and pets, including horses and dogs. After these findings, it has been suggested that there was a relationship between the recovery of these organisms and the use of avoparcin, a glycopeptide antimicrobial drug used as a livestock feed additive in many European countries (21), in an epidemiological study (2), it has been documented that there was an association between the use of glycopeptides in animal production as feed additives and the occurrence of vancomycin resistant Enterococci especially *E.faecium* and *E.feacalis* species with high level resistance to vancomycin in farm animals included poultry and pigs. This association has been most thoroughly investigated for avoparcin-VRE association. The resistant bacteria have spread between animals in the farm environment after the selection of resistant bacteria in food-animals by the antibiotic growth promoters (AGPs). As a consequence of the AGPs use the propagation of food animal reservoir of resistant bacteria which constitute a potential risk for spreading to humans by food intake and animal contact has occurred. Both the spreading of the resistant bacteria from animals to environment and the presence of these bacteria in food chain have been considered as key determinants for spreading to humans (37). Because the vancomycin resistance gene clusters have been found as similar or identical in enterococci of human and animal origin (38), VRE and vancomycin resistant determinants have been considered to be able to spread from animals to humans (37). After the revealing of the avoparcin-vancomycin resistance association, the use of all AGPs including avoparcin and the classes used also in human medicine has been banned in 1997 by European Union. In Turkey, the use of avoparcin and some other feed additives has also been banned by government in 1999 (1). Denmark and Germany had already forbidden the use of avoparcin in 1995 and 1996, respectively. After the ban, the prevalence of VRE in poultry decreased from >80% in 1995 to <5% in 1998 in Denmark, from 100% in 1995 to 25% of samples tested by 1997 in Germany. The prevalence of VRE has also been decreased in faecal samples of healthy persons, from 12% in 1994 to 3% in 1997 (3, 22). Pantosti et al. (28), have reported that the prevalence of VRE in poultry meats decreased from 15%

to 8% in Italy after the avoparcin ban. Lemcke and Bülte (27), have reported the percentage of vanA-VRE isolates from poultry in Germany, Netherlands and France as 14%, 13% and 9%, respectively. Lauderdale et al. (25), have isolated 39 VRE from 28 of 30 chicken carcasses in Taiwan. In Turkey, VRE has been found 13-14% by Çelik (7), in various animal sources. In the results of another study performed in 2005, the isolation percent of VRE from poultry has been reported as 0.25% (34). Kasimoglu-Dogru et al. (19), have reported that no *Enterococcus* isolates from Ankara province in Turkey detected as VRE phenotypically and vanA and vanB genes could not be found in any of these isolates. Similarly, in this study, no VRE was found among the isolates from chicken carcasses and meat samples by multiplex-PCR. This case may associated with the effects of avoparcin (and/or other feed additives) ban. Although the studies have showed that the termination of AGP use resulted in dramatic reduction in occurrence of VRE in food animals, it has been reported that these reductions have not led to disappearance of the strains completely and the resistant strains might be still present in the farm environment, food animals and even in the foodstuffs in low level (37). Thus, although the results of this study in Turkey show the absence of VRE in chicken carcasses, it should not be considered that VRE are not appeared or isolated from various poultry sources anymore.

Slime production and biofilm formation also determined in both *E.faecalis* and *E.faecium* which are the most common enterococci species have been suggested as virulence determinants of clinical isolates (12). Slime factor plays an important role for adhesion and colonization of organ surfaces or food-contact surfaces. If the microorganisms from food-contact surfaces are not completely removed, they may lead to biofilm formation and also increase the biotransfer potential. Also, biofilm formation may lead to food spoilage, contamination and significant economic losses. For these reason, biofilms are an important reservoir of microbial contamination. In addition, if the biofilm bacteria are pathogens, then biofilms pose a serious public health risk (24). It has been reported that enterococci in biofilms are more resistant to antibiotics than planktonically growing enterococci. Therefore, this factor has a great importance for food industry as well as clinical importance.

Çiftci et al. (8), have reported that 60% of *Enterococcus* strains were found as slime positive and 13.43% vancomycin resistant enterococci were obtained from chicken arthritis. They also reported that slime factor productions of enterococci were found as 59.7%. In another study (13), the production of biofilm (slime) has been observed mainly in *E.faecalis* isolates from various clinical sources but only non-numerous strains has formed strong biofilm. However, Gomes et al. (18), have reported that none of the different food isolates presented moderate or strong ability to form biofilm on abiotic surfaces. Similarly, in this study, none of the enterococci isolated from chicken carcasses and meat samples had not ability to form biofilm.

In conclusion, for the moment, Enterococci isolated in this study in Samsun province do not constitute a potential risk for the concern of vancomycin resistant enterococcal infections in humans. Similarly, the slime factor in enterococci isolated from chicken carcasses and meat samples in this study do not pose a hazard for the public health and food industry including poultry slaughterhouse. However, because the completely eliminating of VRE among farm animals including animal origin foods needs for a long time, chicken materials should be screened regularly for especially *E.faecalis* and *E.faecium* which may have a potential vancomycin resistance risk.

## References

1. **Anonym**, T.C. Ministry of Agriculture and Rural Affairs, published in the official gazette date: 9.07.1999/14428.
2. **Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM**, (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med.* 31, 95-112.
3. **Bager F, Aarestrup FM, Madsen M, Wegener HC**, (1999). Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin. *Microb Drug Resist.* 5, 53-56.
4. **Bates J, Jordens JZ, Selkon JB**, (1993). Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci (letter). *Lancet.* 342, 490-1.
5. **Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT**, (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemoth.* 20, 191-196.
6. **Chingwaru W, Mpuchane SF, Gashe BA**, (2003). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. *J Food Protect.* 66, 931-936.

7. Çelik S, (2001) *Virulence factors of Enterococci isolated from animal sources*. PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.
8. Çiftci A, Fındık A, İca T, Bas B, Onuk EE, Güngördü S, (2009). *Slime production and antibiotic resistance of Enterococcus faecalis isolated from arthritis in chickens*. J Vet Med. 71, 849–853
9. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P, (2004). *Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR*. J Clin Microbiol. 42, 5857-5860.
10. Del Grosso M, Caprioli A, Chinzari P, Fontana MC, Pezzotti G, Manfrin A, Giannatale ED, Goffredo E, Pantosti A, (2000). *Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy*. Microb Drug Resist. 6, 313–318.
11. Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Hommez J, Haesebrouck F, (1996). *Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals*. Antimicrob Agents Chemother. 40, 2285–2287.
12. Donelli G, Paoletti C, Baldassarri L, Guaglianone E, Di Rosa R, Magi G, Spinaci C, Facinelli B, (2004). *Sex pheromone response, clumping, and slime production in Enterococcal Strains isolated from occluded biliary stents*. J Clin Microbiol. 42, 3419-3427.
13. Dworniczek E, Wojciech U, Sobieszczanska B, Seniuk A, (2005). *Virulence of enterococcus isolates collected in Lower Silesia (Poland)*. Scand J Infect Dis. 37, 630-636.
14. Eaton TJ, Gasson MJ, (2001). *Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates*. Appl Environ Microb. 67, 1628–1635.
15. Facklam RR, Carvalho MDS, Teixeira LM, (2002). *History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci*. In: GilmoreMS, editor. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology. p. 1–39.
16. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT, (1989). *New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci*. J Clin Pathol. 42, 872-874.
17. Giraffa G, (2002). *Enterococci from foods*. FEMS Microbiol Rev. 26, 163–171.
18. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo CV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM, Martinis ECP, (2008). *Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods*. Food Microbiol. 25, 668-675.
19. Kasimoğlu-Doğru A, Gencay YE, Ayaz ND, (2010). *Prevalence and antibiotic resistance profiles of Enterococcus species in chicken at slaughter level; absence of vanA and vanB genes in E. faecalis and E. Faecium*. Res Vet Sci. 2, 153-158
20. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG, (1999). *Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci*. J Clin Microbiol. 37, 3497-3503.
21. Klare I, Heier H, Claus H, Witte W, (1995). *VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in Enterococcus faecium from animal husbandry*. FEMS Microbiol Lett. 125, 165-72.
22. Klare I, Badstübner D, Konstabel C, Bohme G, Claus H, Witte W, (1999). *Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry*. Microb Drug Resist. 5, 45– 52.
23. Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W, (2003). *Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium*. Int J Food Microbiol. 88, 269– 290.
24. Kumar CG, Anand SK, (1998). *Significance of microbial biofilms in food industry: a review*. Int J Food Microbiol. 42, 9–27.
25. Lauderdale TL, McDonald LC, Shiao YR, Chen PC, Wang HY, Lai JF, Ho M, (2002). *Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-vanA genotype incongruence*. Antimicrob Agents Ch. 46, 525–527.
26. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P, (1992). *Vancomycin resistance gene vanC is specific to Enterococcus gallinarum*. Antimicrob Agents Chemother. 36, 2005-2008.
27. Lemcke R, Bülte M, (2000). *Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in Enterococcus strains isolated from poultry and pork*. Int J Food Microbiol. 60, 185–194.
28. Pantosti A, DelGrosso M, Tagliabue S, Nacri A, Caprioli A, (1999). *Decreased of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban*. Lancet. 354, 741–742.
29. Quintiliani RJr, Evers S, Courvalin P, (1993). *The vanB gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci*. J Infect Dis. 167,1220-1223.
30. Silbergeld EK, Graham J, Price LB, (2008). *Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health*. Annu Rev Publ Health. 29, 151-169.
31. Slanetz LW, Bartley CH, (1957). *Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium*. J Bact. 74, 591-595.
32. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadès JR, Lasa I, (2001). *The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation*. Appl Environ Microb. 67, 4538-4545.
33. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC, (1988). *Vancomycin-resistant enterococci*. Lancet. 1, 57-58.
34. Ünal N, Dilik Z, Yıldırım M, (2010). *Isolation of a vanA positive Enterococcus faecium from commercial broiler farms in Turkey*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16, 127-129.
35. Van den Braak A, Van Belkum A, Van Keulen M, Vliegthart J, Verbrugh HA, Endz HP, (1998). *Molecular characterizations of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients and poultry in the Netherlands*. J Clin Microbiol. 36, 1927-1932.
36. Vural T, Sekercioglu AO, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Yesilipek A, Kocagöz S, Ünal S, Mutlu G, (1998). *Vankomisine dirençli Enterococcus casseliflavus susu*. Ankem Dergisi. 12, 113.
37. Wegener HC, (2003). *Antibiotics in animal feed and their role in resistance development*. Curr Opin Microbiol. 6, 439–445.
38. Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F, (1999). *Use of antimicrobial growth promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe*. Emerg Infect Dis. 5, 329-336.

## Ankara, Konya ve Bolu illerinden toplanan ruminant ve kanatlı yemlerinde toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve okratoksin A kalıntılarının araştırılması

Levent ALTINTAŞ<sup>1</sup>, Hüsamettin EKİCİ<sup>2</sup>, Ender YARSAN<sup>1</sup>, Serkan ÇAKIR<sup>3</sup>,  
Mehmet Fatih EVRENSEL<sup>4</sup>, Berat Selim TOKGÖZ<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

<sup>3</sup>Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mudurnu Süreyya Astarıcı Meslek Yüksekokulu, Bolu

<sup>4</sup>Bolu Tarım İl Müdürlüğü, Bolu

<sup>5</sup>Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü, Adana

Geliş Tarihi / Received: 10.10.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 14.12.2011

**Özet:** Bu çalışmada Ankara, Konya ve Bolu illerinden toplanan ruminant ve kanatlı yemlerinde toplam aflatoksin (AfTotal), aflatoksin B1 (AfB1) ve okratoksin A (OA) düzeylerinin ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlandı. ELISA yöntemi kullanılarak toplam 150 adet hayvan yemi örneğinde AfB1, AfTotal ve 56 adet örnekte de OA analizleri yapıldı. Numunelerin %90,2'sinde (138 adet) AfB1, %90,2'sinde (138 adet) AfTotal ve %91,07'sinde (51 adet) OA farklı düzeylerde saptandı. Analiz edilen yemlerin %5,07'sindeki AfB1 düzeylerinin (7 adet yem) yemlerde bulunmasına izin verilen değerlerin üzerinde olduğu tespit edildi. Benzer şekilde yemlerin %3,92'sindeki (2 adet) OA değerlerinin yemlerde bulunmasına izin verilen değerlerin üzerinde olduğu bulundu. Sonuç olarak, analizleri yapılan yemlerin büyük bir bölümünün mikotoksinler yönünden bulaşık olmasına rağmen, saptanan bu miktarların örneklerin büyük bir bölümünde yemlerde bulunmasına izin verilen sınırlar içerisinde olduğu gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksin B1, ELISA, Okratoksin A, Toplam Aflatoksin.

### Investigation of the total aflatoxin, aflatoxin B1 and ocratoxin A residues in the ruminant and poultry feeds obtained from Ankara, Konya and Bolu

**Summary:** It was aimed to determine the levels of Total Aflatoxin (AfTotal), Aflatoxin B1 (AfB1) and Ocratoxin A (OA) in the ruminant and poultry feed samples collected from Ankara, Konya and Bolu province using ELISA test by the present study. AfB1 and AfTotal analysis in the 150 feed samples and OA analysis in the 56 feed samples were done using ELISA test. AfB1 in the 90,2% of feeds (138 feeds), AfTotal in the 90,2% of feeds (138 feeds) and OA in the 91,07% of feeds (51 feeds) were determined in the different levels. AfB1 levels in the 5,07% of feeds analysed (7 feeds) were determined to be higher than the values permitted in the feeds. Similarly OA values in the 3,92% of feeds (2 feeds) were found to be higher than the the values permitted in the feeds. Although most of the feeds were contaminated with mycotoxins, nearly all of the present values were seen in the limitations permitted in the notification for Maximum Contaminant Limits in Food Materials and in Feed Regulation.

**Key words:** Aflatoxin B1, ELISA, Ocratoxin A, Total Aflatoxin.

### Giriş

Hayvansal üretimin artırılabilmesi için hayvanların en üst düzeyde ve iyi kaliteli yemlerle beslenmesi gereklidir. Bunun için rasyondaki besin maddelerinin içeriğinin hayvanın gereksinimini karşılayabilecek düzeyde ve zararlı mikroorganizmalardan da arınmış bir halde olması şarttır. Mikotoksinler, çeşitli mantar türleri tarafından sentezlenen ve maruziyete bağlı olarak insan ve hayvanlarda olumsuz etkiler meydana getiren, küfler tarafından salgılanan

ikincil metabolitler olup, gıda ve yemlerde bulduklarında insan ve hayvan sağlığını tehdit edecek derecede önemli patolojik veya istenmeyen fizyolojik değişikliklere neden olurlar. Mikotoksin terimi mantar anlamına gelen “myco” ve zehir anlamına gelen “toxin” kelimelerinin birleşmesinden türetilmiştir. Mikotoksikozis ise mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Yem ve yem hammaddelerinde mikotoksin kirliliğinin bilinmesi bu yönüyle önemlidir. Bu amaçla farklı analiz yöntemleri kullanıla-

rak sürekli şekilde belirli dönemlerde saha taramaları gerçekleştirilmelidir (2, 6, 10, 13-16, 26, 29).

Mikotoksinler, üretici mantar çeşidine, kimyasal yapılarına ve öncelikle etdikleri organ, doku ve sisteme göre sınıflandırılırlar. Mikotoksinler içinde önem yönünden ilk sırayı aflatoksinler alır. Aflatoksin, genellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türlerine ait küf mantarları tarafından meydana getirilen bir grup toksik küf metabolitinin genel ismidir. Aflatoksin terimi genellikle AfB1, AfB2, AfG1, AfG2, AfM1 ve AfM2 diye bilinen 6 ana bileşiği karşılar. Kanatlıların duyarlılığı ve alınan toksinin miktarına bağlı olarak, aflatoksinler akut, subakut ve kronik nitelikte zehirlenmelere yol açarlar (2, 4, 7, 11, 14, 15, 17, 18, 25, 29, 31, 32).

Önemli mikotoksinlerden bir diğeri de okratoksinlerdir. Okratoksinler vücutta protein, DNA ve RNA sentezini etkiler. Okratoksinler hayvanlarda akut, subakut ve kronik nitelikte zehirlenmelere sebep olurlar; ayrıca, teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri de vardır. Okratoksinler, başta *A.ochraceus* (*A.alutacus* diye de bilinir) ve *P.viridicatum* olmak üzere, bu iki cinse bağlı çok sayıda tür tarafından hazırlanan bir grup mikotoksinlerdir; en önemlileri Okratoksin A (OA), Okratoksin B (OB), Okratoksin C (OC), OA'nın metil ve OB'nin metil ve etil esterleridir. Bunlardan OA ve seyrek olarak da OB'ye yem ve yem hammaddelerinde kirletici olarak rastlanır (10, 12-14, 18, 25, 28, 29).

Bu çalışmayla Ankara, Konya ve Bolu illerindeki yem satış bayilerinden toplanan küçükbaş, büyükbaş ve kanatlı yemlerinde AfTotal, AfB1 ve OA kalıntılarının bulunup bulunmadığının ELISA yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Toplanan yem numunelerinde AfTotal, AfB1 ve OA yönünden analizler, ELISA yöntemini esas alan RIDASCREEN® test kitine göre yapıldı.

**Ekstraksiyon işlemleri:** AfTotal için; ikişer gram örnek alındı ve üzerlerine 10 ml metanol/distile su (70/30; v/v) eklendi. Numuneler homojen olacak şekilde 10 dk. süre ile oda ısısında çalkalandı. Bu işlem sonra kağıt filtreden süzülen numuneden 100 µl alınıp, üzerine 600 µl distile su eklendi ve bu sıvıdan 50 µl test aşamasında kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında örneklerde mikotoksin varlığı kit içerisindeki standartla karşılaştırılarak yapıldı. Ölçümler

fotometrik olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar absorban değeri şeklinde alındı.

AfB1 için; beşer gram örnek alındı ve üzerlerine 25 ml %70'lik metanol eklendi. Numuneler 3 er dk. karıştırıldı ve Whatman No.1 süzgeç kağıdından süzüldü. 1 ml süzüntü üzerine 1 ml deiyonize su eklendi ve bu sıvıdan 50 µl test aşamasında kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında örneklerde mikotoksin varlığı kit içerisindeki standartla karşılaştırılarak yapıldı. Ölçümler fotometrik olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar absorban değeri şeklinde alındı.

OA için; ikişer gram örnek alındı ve üzerlerine 5 ml 1 N HCL eklendi. 5 er dk. karıştırıldı. 10 ml diklorometan eklendi, karıştırıldı ve 15 dk santrifüj (3500 rpm) yapıldı. Oluşan pastanın üstündeki sıvı alındı, geri kalan kısımlar tamamıyla süzüldü. Süzüntü miktarı kadar 0.13 M sodyum hidrojen karbonat buffer eklendi, karıştırıldı ve 15 dk santrifüj (3500 rpm) yapıldı. Üst kısımdan 100 µl alarak ephendorf tüplerine kondu. Üzerine 400 µl 0.13 M sodyum hidrojen karbonat buffer eklendi ve bu sıvıdan 50 µl test aşamasında kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında örneklerde mikotoksin varlığı kit içerisindeki standartla karşılaştırılarak yapıldı. Ölçümler fotometrik olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar absorban değeri şeklinde alındı.

**Test işlemleri:** AfTotal için; mikroplyttteki ilk 6 kuyucuğa standartlardan, sonraki kuyucuklara ise numunelerin her birinden 50 µl konuldu. Üzerlerine 50 µl sulandırılmış enzim konjugat ve 50 µl antibody solüsyonu eklenip karıştırıldı. 30 dk karanlık ortamda ve oda ısısında bekletildi. Daha sonra 250 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı ve işlem sonucunda iyice kurulandı. Üzerlerine 100 µl substrat/kromojen eklenip karıştırıldı ve 15 dk karanlık ortamda, oda ısısında bekletildi. Süre sonunda 100 µl stop solüsyonu eklenip karıştırıldı. 30 dakika içerisinde 450 nm'de ELISA Reader'da okundu.

AfB1 için; mikroplyttteki ilk 6 kuyucuğa standartlardan, sonraki kuyucuklara ise numunelerin her birinden 50 µl konuldu. Üzerlerine 50 µl sulandırılmış enzim konjugat ve 50 µl anti-aflatoksin antibody solüsyonu eklenip karıştırıldı. 30 dk karanlık ortamda ve oda ısısında bekletildi. Daha sonra 250 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı ve işlem sonucunda iyice kurulandı. Üzerlerine 100 µl substrat/kromojen eklenip karıştırıldı ve 15 dk karanlık ortamda, oda ısısında bek-

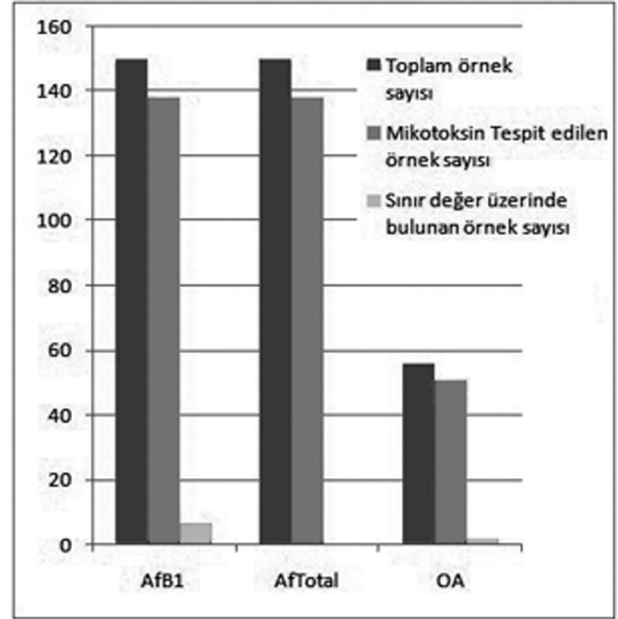
letildi. Süre sonunda 100 µl stop solüsyonu eklenip karıştırıldı. 15 dakika içerisinde 450 nm’de ELISA Reader’da okundu.

OA için; mikropleyttteki ilk 6 kuyucuğa standartlardan, sonraki kuyucuklara ise numunelerin her birinden 50 µl konuldu. Üzerlerine 50 µl sulandırılmış enzim konjugat eklenip karıştırıldı. 30 dk karanlık ortamda ve oda ısısında bekletildi. Daha sonra 250 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı ve işlem sonucunda iyice kurulandı. Üzerlerine 100 µl substrat/kromojen eklendi ve 15 dk karanlık ortamda, oda ısısında bekletildi. Süre sonunda 100 µl stop solüsyonu eklendi. 30 dakika içerisinde 450 nm’de ELISA Reader’da okundu.

**Analiz yöntemleri:** Elde edilen bu değerler Ridasoft Win® Paket programına girildi. Kantitatif değerlendirme ise çizilecek standart eğriye göre yapıldı ve hesaplanan değerler “26.07.2010 tarih ve 27653 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/33” ve “29.09.2010 tarih ve 27714 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/46”ya göre izin verilen değerlere uygunluğu açısından değerlendirildi.

## Bulgular

Toplam 150 adet hayvan yemi örneğinde ELISA yöntemi kullanılarak AfB1, AfTotal ve 56 adet örnekte de OA analizleri yapıldı ve numunelerin %90,2’sinde (138 adet) AfB1, %90,2’sinde (138 adet) AfTotal (Tablo 1) ve %91,07’inde (51 adet) OA farklı düzeylerde saptandı (Şekil 1).



**Şekil 1.** Analizler sonucunda AfTotal, AfB1 ve OA varlığı tespit edilen yem örneği sayıları.

Analiz edilen yemlerin %5,07’sindeki AfB1 düzeylerinin (7 adet yem) (26.07.2010 tarih ve 27653 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/33) yemlerde bulunmasına izin verilen değerlerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Benzer şekilde yemlerin %3,92’sindeki OA düzeylerinin (2 adet yem) (29.09.2010 tarih ve 27714 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/46) yemlerde bulunmasına izin verilen değerlerin üzerinde olduğu bulunmuştur (Tablo 3).

**Tablo 1.** Analizi gerçekleştirilen yemlerdeki AfTotal düzeyleri.

İl	Yem Çeşidi	Adedi	0-5 ppb	5-10 ppb	10-20 ppb	20 ppb üzeri
Ankara	Kanatlı (Civciv)	6	4	2	-	-
	Kanatlı (Yetişkin)	4	4	-	-	-
	Kuzu Yemi	6	6	-	-	-
	Koyun-Keçi Yemi	12	8	4	-	-
	Buzağı Yemi	6	4	2	-	-
	Süt Sığırı	11	11	-	-	-
	Sığır Yemi	11	10	-	1	-

TOPLAM		56	47	8	1	-
	Kanatlı (Civciv)	8	4	1	3	-
	Kanatlı (Yetişkin)	12	3	4	5	-
	Kuzu Yemi	6	3	3	-	-
Bolu	Koyun-Keçi Yemi	4	3	1	-	-
	Buzağı Yemi	6	4	1	-	1
	Süt Sığırı	6	1	4	1	-
	Sığır Yemi	7	4	2	-	1
TOPLAM		49	22	16	9	2
	Kanatlı (Civciv)	5	2	3	-	-
	Kanatlı (Yetişkin)	7	-	5	2	-
	Kuzu Yemi	6	3	2	1	-
Konya	Koyun-Keçi Yemi	5	1	3	1	-
	Buzağı Yemi	5	3	2	-	-
	Süt Sığırı	8	3	3	1	1
	Sığır Yemi	9	2	3	2	2
TOPLAM		45	14	21	7	3

**Tablo 2.** Analizi gerçekleştirilen yemlerdeki AfB<sub>1</sub> düzeyleri ve 26.07.2010 tarih ve 27653 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/33’e göre uygunlukları.

İl	Yem Çeşidi	Adedi	0-5 ppb	5-10 ppb	10-20 ppb	20 ppb üzeri	Yemlerin Uygunluğu
	Kanatlı (Civciv)	6	6	-	-	-	%100
	Kanatlı (Yetişkin)	4	4	-	-	-	%100
	Kuzu Yemi	6	6	-	-	-	%100
Ankara	Koyun-Keçi Yemi	12	8	4	-	-	%100
	Buzağı Yemi	6	6	-	-	-	%100
	Süt Sığırı	11	11	-	-	-	%100
	Sığır Yemi	11	10	1	-	-	%100
TOPLAM		56	51	5	-	-	%100
	Kanatlı (Civciv)	8	5	3	-	-	%100
	Kanatlı (Yetişkin)	12	3	6	3	-	%100
	Kuzu Yemi	6	3	3	-	-	%100
Bolu	Koyun-Keçi Yemi	4	3	1	-	-	%100
	Buzağı Yemi	6	4	1	1*	-	%83,33
	Süt Sığırı	6	4	2*	-	-	%66,66
	Sığır Yemi	7	6	-	1	-	%100
TOPLAM		49	28	16	5		%93,87

	Kanatlı (Civciv)	5	4	1	-	-	%100
	Kanatlı (Yetişkin)	7	3	4	-	-	%100
	Kuzu Yemi	6	3	3	-	-	%100
Konya	Koyun-Keçi Yemi	5	3	2	-	-	%100
	Buzağı Yemi	5	4	1	-	-	%100
	Süt Sığırı	8	5	1*	1*	1*	%62,5
	Sığır Yemi	9	4	2	2	1*	%88,88
TOPLAM		45	26	14	3	2	%91,11

\* : Uygun olmayan örnekler.

**Tablo 3.** Analizi gerçekleştirilen yemlerdeki OA düzeyleri ve 29.09.2010 tarih ve 27714 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/46’ya göre uygunlukları.

İl	Yem Çeşidi	Adedi	0-2 ppb	2-3 ppb	3-5 ppb	5 ppb üzeri	Yemlerin Uygunluğu
	Kanatlı (Civciv)	6	3	3	-	-	%100
	Kanatlı (Yetişkin)	4	2	2	-	-	%100
	Kuzu Yemi	6	2	4	-	-	%100
Ankara	Koyun-Keçi Yemi	12	8	4	-	-	%100
	Buzağı Yemi	6	3	3	-	-	%100
	Süt Sığırı	11	5	5	1*	-	%90,90
	Sığır Yemi	11	4	6	1*	-	%90,90
TOPLAM		56	27	27	2	-	%96,42

\* : Uygun olmayan örnekler.

## Tartışma ve Sonuç

Aflatoksin ve okratoksin, uygun şartlar oluştuğu takdirde hızla üreyerek mikotoksin üretebilen mantarlar tarafından oluşturulan zehirlerdir. Bunların arasında da en tehlikelisi aflatoksinler için AfB1 ve okratoksin için ise OA’dır. Bu sebeple yemlerde gerek AfB1 gerekse OA bulunması ve bunların miktarı, yemin kalitesi ve yemdeki toplam aflatoksin ya da okratoksin miktarını göstermesi açısından da son derece önemlidir. Aflatoksin ve okratoksinin zehirli etkileri sebebiyle hayvan yemlerinde belirli düzeyin altında bulunmaları gerekir. Bu sebeple yemde bulunması gereken miktarları birçok ülkede sınırlandırılmıştır. Ülkemizde Tarım, Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayımlanan tebliğde (2005/3) yem ve yem hammaddelerinde bulunmasına izin verilen AfB1 miktarları; yetişkin sığır, koyun, keçi, kanatlı ve domuz tam ve tamamlayıcı yemleri için 20 ppb, genç hayvan tam yemleri için 10 ppb, süt

sığırı tam yemleri ve diğer tamamlayıcı yemler için ise 5 ppb olarak belirlenmiştir. Ayrıca Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre OA için de işlenmemiş tahıl tanelerinde 5 ppb, tahıllardan elde edilen tüm ürünler için de 3 ppb sınır değer olarak belirlenmiştir. Bu değerler ülkelere göre farklılık gösterdiği gibi zamanla da güncellenebilir değerlerdir (9, 15, 21, 22).

Yemlerde mikotoksin tayini için ELISA testinin kullanılması testin tekrarlılığı, uygulanabilirliği, doğruluğu, zamandan tasarruf sağlanması, duyarlılığının yüksek olması gibi uygulayıcıya pek çok avantaj sağlar (6, 9).

Gerek yurtdışında gerekse yurtiçinde daha önce mikotoksin kalıntısı taraması üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Almanya’da 1982 yılında yapılan bir araştırmada yem örneklerinin %10,2’sinde AfB1 kalıntısı tespit edilmiştir. Amerika’da yapılan iki farklı araştırmada ise; 1964-1972 yılları arasın-

da analizi yapılan örneklerin %6,03'ünde değişik düzeylerde AfB1 tespit edilirken, 1976-1980 yılları arasında ise örneklerin %45,7'sinin 1000 ppb'ye kadar AfB1 içerdiği tespit edilmiştir. Sungur ve Pamuk (27) tarafından yapılan bir çalışmada analiz edilen mısır örneklerinin %54,2'sinde aflatoksin kirliliği tespit edilmiştir. Özkazanç ve ark. (20) tarafından 1986-1989 yılları arasında yem ve yem hammaddeleri üzerinde yapılan mikotoksin kirliliğinin araştırılmasında bu kirlilik oranları sırasıyla %30,6; %21,7; %26,6 ve %24,1 olarak tespit edilmiştir. Nizamlioğlu (19) tarafından yapılan bir çalışmada ise 1993-1995 yılları arasında analiz edilen yem ve yem hammaddelerinin yıllara göre aflatoksin yönünden kirlilikleri sırasıyla %66,3; %39,6 ve %19,4 olarak tespit edilmiştir. Doğan ve Bayezit (9) tarafından yapılan bir çalışmada da analizi yapılan örneklerin %92'sinin aflatoksin yönünden hayvanlar tarafından tüketilmesinde sakınca olmadığını tespit etmişlerdir. Araguas ve ark. (1) tarafından yapılan bir araştırmada, 72 farklı tahıl kökenli ürün OA yönünden analiz edilmiş, bunlardan %79'unda OA kirliliği saptanmasına rağmen sadece 2 örneğin izin verilen sınır değerlerin üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Ayçiçek ve ark. (5) tarafından yapılan bir çalışmada ise 91 adet fındık kökenli gıda örneği AfB1 kirliliği açısından araştırılmış ve bu örneklerin %94,83'ünde AfB1 tespit edilmiş; ancak bunlardan sadece 2 adedinin yasal sınırların dışında olduğu bildirilmiştir. Dashti ve ark. (8) ise 84 adet hayvan yemi numunesini AfTotal yönünden analizlerini gerçekleştirmişler ve bu örneklerin %79,8'inde AfTotal kirliliğini saptamışlar ve bu örneklerden de sadece 1 tanesinin yasal sınırlar dışında AfTotal içerdiğini tespit etmişlerdir. Vega ve ark. (30) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise 91 adet tahıl ürününden yalnızca 1 adedinin izin verilen değerlerin dışında OA içerdiğini tespit etmişlerdir. Arslan ve Eşsiz (3) silajlardaki AfB1 ve total aflatoksin düzeylerini genelde kabul edilebilir sınırların üzerinde bulmuşlardır.

Yapılan bu çalışmada ise analizi yapılan numunelerin %90,2'sinde (138 adet) AfB1, %90,2'sinde (138 adet) AfTotal ve %91,07'sinde (51 adet) OA farklı düzeylerde saptanmasına rağmen; analiz edilen yemlerin %5,07'sindeki AfB1 düzeylerinin (7 adet yem) (26.07.2010 tarih ve 27653 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/33) yemlerde bulun-

masına izin verilen değerlerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde yemlerin %3,92'sindeki (2 adet) OA değerlerinin (29.09.2010 tarih ve 27714 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ; Tebliğ No: 2010/46) yemlerde bulunmasına izin verilen değerlerin üzerinde olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak analizi gerçekleştirilen numunelerin büyük bir kısmında tespit edilen gerek AfTotal ve AfB1 gerekse OA miktarları hayvanların sağlığını ve verimini olumsuz yönde etkileyebilecek düzeylerde olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca yine bu örneklerin tamamına yakınının (AfB1 için %94,93, OA için %96,42) yemlerde bulunmasına izin verilen miktarlar dahilinde aflatoksin ve okratoksin içerdikleri saptanmıştır. Yemlerin mikotoksinler yönünden kontrollerinin devamlı olarak belirli periyotlarda yapılması gereklidir. Bu sebeple bu tür mikotoksin tarama çalışmalarının sürekli güncellenmesinde fayda olacağı da aşikârdır. Yapılan bu çalışma sonuçlarına göre yemlerin büyük bir bölümünde AfTotal, AfB1 ve OA miktarlarının kabul edilebilir sınırlar içerisinde olması da ayrıca önemli bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

## Kaynaklar

1. Araguas C, Penas EG, Cerain AL, (2005). *Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain*. Food Chemistry. 92, 459-464.
2. Arda M, (1980). *Mikoloji*. A.Ü. Vet. Fak. Yay. No: 366. Ankara. S: 260-272.
3. Arslan C, Eşsiz D, (2009). *Establishing the Optimum Cutting Date and Additives for Pasture Grass Silage and Its Mycotoxin Levels*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 15, 531-538.
4. Arslan C, Eşsiz D, (2009). *Nutrient Composition and Mycotoxin Residues in the Hay Stored as Stack Forms During the Storage Period, and Aflatoxin M1 in the Milk of the Cows Fed by Them*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 15, 697-704.
5. Ayçiçek H, Aksoy A, Saygi S, (2005). *Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey*. Food Control. 16, 263-266.
6. Beltran E, Ibanez M, Sancho JV, Cortes MA, Yusa V, Hernandez F, (2011). *UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk*. Food Chemistry. 126, 737-744.
7. Betina V, (1989). *Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects*. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. P: 437.
8. Dashti B, Al-Hamli S, Alomirah H, Al-Zenki S, Abbas AB, Sawaya W, (2009). *Levels of aflatoxin M1 in milk*,

- cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. Food Control. 20, 686-690.
9. **Doğan A, Bayezit M,** (1999). *Kars yöresinde yemlerde aflatoksin B1 düzeylerinin ELISA yöntemi ile araştırılması.* Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 5(1), 63-70.
  10. **Duarte SC, Lino CM, Pena A,** (2011). *Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects.* Vet Microbiol. 154, 1-13.
  11. **Fallah AA,** (2010). *Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran.* Food Chem Toxicol. 48, 988-991.
  12. **Hussein HS, Brasel JM,** (2001). *Toxicity, metabolis and impact of mycotoxin on humans and animals.* Toxicology. 167 (2), 101-134.
  13. **Karagözlü N, Karapınar M,** (2000). *Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okatoksin-A ve Fungal Kontaminasyon.* Turk J Biol. 24, 561-572.
  14. **Kaya S,** (1989). *Yem ve besinlerdeki mikotoksinler: İnsan ve hayvan sağlığı için önemleri.* Ankara Üniv Vet Fak Derg. (31), 226-253.
  15. **Kaya S,** (2002). *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji.* İkinci baskı. Ankara: Medisan Yayın, p: 537-574.
  16. **Kaya S, Yarsan E,** (1995). *Yem ve yem hammaddelerinde küflenmenin önlenmesi ve mikotoksinlerle kirletilmiş bu tür yemlerin değerlendirilmesine yönelik uygulamalar.* Ankara Üniv Vet Fak Derg. 42 (2), 111-122.
  17. **McKean C, Tang L, Tang M, Billam M, Wang Z, Theodorakis CW, Kendall RJ, Wang JS,** (2006). *Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells.* Food Chem Toxicol. 44, 868-876.
  18. **Miller JD,** (1995). *Review-Fungi and mycotoxins in grain. Implications for stored product research.* J Stored Prod Res. 31(3), 309-328.
  19. **Nizamlıoğlu F,** (1996). *Mikotoksin şüphesiyle laboratuara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 araştırılması.* Veterinarium. 7 (1-2), 42-45.
  20. **Özkazanç AN, Russel-Sin H, Şanlı Y, Kaya S,** (1992). *Türkiye'nin değişik bölgelerinde üretilen karma yem ve yem hammaddelerinin mikotoksinlerle kirlenme durumunun incelenmesi.* Ankara Üniv Vet Fak Derg. 39 (1-2), 268-290.
  21. **Resmi Gazete,** (2002). *Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ.* 23.09.2002 tarih ve 24885 sayılı Resmi Gazete. Tebliğ No: 2002/63.
  22. **Resmi Gazete,** (2005). *Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ.* 05.02.2005 tarih ve 25718 sayılı Resmi Gazete. Tebliğ No: 2005/3.
  23. **Resmi Gazete,** (2010a). *Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ.* 26.07.2010 tarih ve 27653 sayılı Resmi Gazete. Tebliğ No: 2010/33.
  24. **Resmi Gazete,** (2010b). *Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ.* 29.09.2010 tarih ve 27714 sayılı Resmi Gazete. Tebliğ No: 2010/46.
  25. **Richard JL, Bennett GA, Ross PF, Nelson PE,** (1993). *Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food.* J Anim Sci. 71 (9), 2563-2574.
  26. **Soyöz M, Özçelik N,** (2002). *Okrotoksin A'nın Toksik Etkileri ve Eliminasyonu.* T Klin Tıp Bilimleri. 22, 421-427.
  27. **Sungur S, Pamuk F,** (1989). *Türkiye'nin değişik bölgelerinden temin edilen mısır örneklerinde aflatoksin tayini.* Tur Hij Den Biyol Derg. 46, 69-75.
  28. **Tessini C, Mardones C, Von Baer D, Vega M, Herlitz E, Saelzer R, Silva J, Torres O,** (2010). *Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of Ochratoxin A in red wine using fluorescence detection.* Analytica Chimica Acta. 660, 119-126.
  29. **Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA,** (2009). *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review.* Analytica Chimica Acta. 632, 168-180.
  30. **Vega M, Munoz K, Sepulveda C, Aranda M, Campos V, Villegas R, Villarroel O,** (2009). *Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market.* Food Control. 20, 631-634.
  31. **Visconti A, Marasas WF, Miller JD, Riley R,** (1999). *Proceedings of third joint FAO/WHO/UNEP international conference on mycotoxins, march 3-6, Tunis, Tunisia.* Erişim adresi: <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/mycoto/papers/myco5a.pdf>. Erişim Tarihi: 24.06.2010.
  32. **Voss KA, Norred WP, Plattner RD, Bacon CW,** (1989). *Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with fields cases of equine leucoencephalomalacia.* Food Chem Toxicol. 27 (2), 89-96.

## Nevşehir ilindeki köpeklerde Listeriosis ve Toxoplasmosis'in seroprevalansının araştırılması

Akın KIRBAŞ<sup>1</sup>, Cahit BABÜR<sup>2</sup>, İbrahim BALKAYA<sup>3</sup>, Ünal YAVUZ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum

<sup>2</sup>Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Parazitoloji Lab. Ankara

<sup>3</sup>Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum

<sup>4</sup>At ve Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığı, Hayvan Hastanesi, Nevşehir

Geliş Tarihi / Received: 24.10.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 15.12.2011

**Özet:** Bu araştırma Nevşehir ilindeki askeri köpeklerde listeriosis ve toxoplasmosisin seroprevalansının belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla toplam 140 adet köpekten serum örneği toplandı. Serum örneklerinde *Listeria monocytogenes* antikorları Osebold Aglutinasyon testi, *Toxoplasma gondii* antikorları ise Sabin-Feldman boya testi ile araştırıldı. Serum örneklerinin %28.57'sinde (40/140) *L.monocytogenes*, %57.86'sında (81/140) *T.gondii*'ye karşı şekillenen antikorlara rastlandı. *L.monocytogenes* seropozitifliği dişilerde %33.76 (26/77) erkeklerde ise %22.22 (14/63) olarak tespit edildi ( $p>0.05$ ). *Toxoplasma gondii* seropozitifliği ise dişilerde %62.34 (48/77) erkeklerde %52.38 (33/63) olarak belirlendi ( $p>0.05$ ). *Toxoplasma gondii* seropozitifliği 3 yaşından büyük olanlarda %75.00 (33/44) ve 3 yaşından küçük olanlarda % 50,00 (48/96) oranında saptandı ( $p<0.05$ ). Bu çalışma ile Nevşehir ilinde askeri birliklerde kullanılan köpeklerde *L.monocytogenes* ve *T.gondii*'nin yüksek seroprevalansa sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Halk sağlığı açısından ciddi risk oluşturması nedeni ile bu enfeksiyonların önlenmesine yönelik gerekli tedbirler alınmalıdır.

**Anahtar sözcükler:** *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, Köpek, Seroprevalans, Nevşehir

### Investigation of the seroprevalence of Listeriosis and Toxoplasmosis in dogs in Nevşehir province

**Summary:** The aim of this study was to detect seroprevalence of listeriosis and toxoplasmosis in military dogs in Nevşehir province. A total of 140 dog sera were tested using Osebold Agglutination Test for *Listeria monocytogenes* and Sabin-Feldman Dye Test for *Toxoplasma gondii* antibodies. 28.57% (40/140) were detected to be seropositive for *L.monocytogenes* and 57.86% (81/140), for *T.gondii*. The seropositivity for *L.monocytogenes* was 22.22% (14/63) in males and 33.76% (26/77) in female dogs ( $p>0.05$ ). *Toxoplasma gondii* seropositivity was detected to be 52.38% (33/63) in males and 62.34% (48/77) in female dogs ( $p>0.05$ ). *Toxoplasma gondii* seropositivity was 75.00% (33/44) in dogs over 3 years old and 50.00% (48/96) in those less than 3 years of age ( $p<0.05$ ). In this study, the high seroprevalence of *L.monocytogenes* and *T.gondii* in military dogs used by troops in Nevşehir province suggests that these infections are prevalent. Prophylactic measures should be taken in order to prevent infections due to severe risks to public health.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, Dog, Seroprevalence, Nevşehir

### Giriş

Listeriosis ve toxoplasmosis insan ve hayvan sağlığı yönünden önemli olan ve dünyada yaygın olarak gözlenen enfeksiyöz zoonozlardır (6, 7, 24).

Listeriosis, fakültatif intraselüler patojenik bir etken olan *Listeria monocytogenes* tarafından oluşturulan, genellikle sporadik, zaman zaman enzootik olarak ortaya çıkan zoonotik bir enfeksiyondur (10, 14, 25). Etken insan ve hayvanların normal bağırsak florasında bulunmaktadır. Enfekte insan ve hayvanlar sağlıklı görünseler de etkeni dışkıları ile etrafa saçabilmekte ve portör görevi yapmaktadırlar (25).

Listeriosis köpeklerde genel septisemik enfeksiyon şeklinde ve subklinik şekilde seyreder (12). Etken köpeklerde gençlik hastalığı gibi primer faktörlerin varlığında ciddi patojenik etki ortaya koyabilmektedir (5, 34).

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde köpeklerde *L.monocytogenes* üzerine seroepidemiolojik araştırmalar yapılmış (3, 7, 14, 19, 21), ayrıca köpeklerin dışkılarında da kültürel yöntemlerle *L.monocytogenes* izole edilmiş ve köpeklerin fekal taşıyıcı ve rezervuar olduğu net olarak gösterilmiştir (25).

Toxoplasmosis, zorunlu hücre içi bir protozoon olan *Toxoplasma gondii* tarafından oluşturulan, zoonotik protozoer bir hastalıktır. Kesin konakçısı kedi ve kedigiller olan protozoon, insana, kedi ve kedigillerin ookistli dışkılarıyla kontamine olmuş besinlerle, doku kisti taşıyan çiğ veya az pişmiş etlerin sindirim yoluyla alınmasıyla ve enfekte aneden fetüse plasenta ile bulaşmaktadır. Ayrıca kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu ile de bulaşma olduğu bilinmektedir (4, 16, 37).

*Toxoplasma gondii* ile insanların enfeksiyonunda, insanların yaşam alanlarının hemen hemen tamamını kullanan, kedi başta olmak üzere pek çok yabancı hayvan ile de ilişkileri olan köpeklerin mekanik taşıyıcılıkları oldukça önemli bir faktördür (16, 26, 36). *Toxoplasma gondii* köpeklerde enteroepitelyal siklus geçirmemesine rağmen kedilerden ziyade, köpeklerle teması olan çocuk ve gençlerde toxoplasmosisin daha çok görülmesi oldukça önemsenmesi gereken bir durumdur (35).

Toxoplasmosis köpeklerde genellikle asemptomatik bir seyir izler. Şiddetli olgularda, solunum güçlüğü, öksürük, anemi, ishal, felç ve abort gibi klinik bulguların yanı sıra, beyin, akciğer ve karaciğerde lokal nekrotik alanların bulunabileceği bildirilmiştir (24, 35, 36).

Listeriosisin tanısında etken izolasyonu ve identifikasyonu temeldir (27, 28). Bunun yanında etken polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler teknikler (28) ve etkene karşı oluşan antikolar; aglütinasyon testi, immunopresipitasyon, pasif immunohemolizis, komplement fiksasyon testi (CFT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve indirekt floresans antikor testi (IFAT) gibi serolojik testlerle belirlenmektedir (27, 28). Toxoplasmosis tanısında ise, CFT, IFAT, ELISA, indirekt hemaglütinasyon testi (IHAT), latex aglütinasyon testi (LAT) (11, 30, 38) ve sıklıkla Sabin-Feldman Boya testi (SF) kullanılmaktadır (8, 9).

Bu çalışmada Nevşehir ilindeki klinik olarak sağlıklı askeri köpeklerde cinsiyet ve yaş gruplarına göre Osebold Aglütinasyon testi (OAT) ile *L.monocytogenes* ve SF yöntemi ile *T.gondii*'nin seroprevalansının belirlenmesi amaçlandı.

### Materyal ve Metot

**Örneklerin Toplanması:** Araştırmanın materyalini Nevşehir ilindeki At ve Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığında bulunan (bomba, mayın,

narkotik, devriye ve iz takip) ve yaşları 6 ay ile 8 yaş aralığında olan toplam 140 adet (63 erkek, 77 dişi) köpek oluşturdu. Köpeklerin *Vena cephalica antebrachii*'sinden antikoagülsüz tüplere 10 ml kan alındı. Laboratuara getirilen kan örnekleri oda ısısında 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve serolojik testlerle çalışılana kadar -20 oC'de muhafaza edildi.

### Serolojik İnceleme

**Osebold Aglütinasyon Testi:** *Listeria monocytogenes* antikoları için tüm serumlara Osebold Aglütinasyon Testi (OAT) uygulandı. OAT yönteminde test antijenleri Refik Saydam Hıfızsızihha Merkezi Başkanlığı (RSHM) Salgın Hastalıklar Araştırmalar Müdürlüğü (SHAM) Parazitoloji Laboratuvarında hazırlandı. Öncelikle çapraz reaksiyonların önlenmesi amacı ile *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (ATCC 29213) suşundan tüm hücre antijenleri elde edildi. *L.monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 3c, 4ab, 4c ve 4d suşlarından ayrı ayrı antijenler hazırlanarak, bu antijenlerin birleştirilmesi ile *L.monocytogenes* ortak antijen havuzu elde edildi (29). Serum örneklerinin *S.aureus* antijeniyle absorpsiyonunu takiben *L.monocytogenes* antijeniyle aglütinasyon testi yapıldı. 1/100 ve üzerindeki titrelerde en az iki (+) sonuç veren aglütinasyonlar pozitif olarak kabul edildi (7).

**Sabin-Feldman Boya Testi:** Tüm serumlar Refik Saydam Hıfızsızihha Merkezi Başkanlığı (RSHM) Salgın Hastalıklar Araştırmalar Müdürlüğü (SHAM) Parazitoloji Laboratuvarında SF yöntemi (31) ile anti-*Toxoplasma gondii* antikoları yönünden incelendi. Serumlar 56 °C'de 30 dk inaktive edildikten sonra 1/16, 1/64, 1/256 ve 1/1024 titrelerde serum fizyolojik ile sulandırıldı ve ilgili prosedür takip edildi. Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS (sürüm 11.5 Microsoft) istatistik programında Mann-Whitney testi kullanıldı.

### Bulgular

Osebold Aglütinasyon testi ile incelenen köpek serumlarının 40'ında (%28.57) *L.monocytogenes* antikoru saptandı. Seropozitif serumların 32'sinde (%80.00) 1/100 titrede, 8'inde (%20.00) 1/200 titrede pozitiflik tespit edildi. *L.monocytogenes* seropozitifliği saptanan köpeklerin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 1'de verildi. Tablo 1'den anlaşılacağı gibi *L.monocytogenes* seropozitifliği

dişilerde %33.76 (26/77) erkeklerde ise %22.22 (14/63) olarak tespit edildi. Cinsiyet ve yaş grupları arasında *L.monocytogenes* seropozitifliğinin istatistikî önemi ( $p>0.05$ ) saptanmadı.

**Tablo 1.** Köpeklerde OAT ile saptanan *L.monocytogenes* seropozitifliğinin ve antikor titrelerinin cinsiyet ve yaşa göre dağılımı

Cinsiyet/Yaş	Serum sayısı	Pozitif örnek sayısı	Pozitiflik yüzdesi (%)	Antikor titreleri	
				1/100	1/200
Dişi *	77	26	33.76	20	6
Erkek *	63	14	22.22	12	2
≤3**	96	23	23.96	20	2
>3**	44	17	38.64	12	6
Total	140	40	28.57	32	8

p:0.096\*, p:0.060\*\*

Sabin-Feldman boya testi ile incelenen köpek serumlarının 81'inde (%57.86) *T.gondii* antikoruna belirlendi. Seropozitif bulunan serumların 47'sinde (%58.02) 1/16 titrede, 25'inde (%30.86) 1/64 titrede, 8'inde (%9.88) 1/256 titrede ve 1'inde (%1.23) 1/1024 titrede pozitiflik saptandı. *Toxoplasma gondii* yönünden seropozitif bulunan köpeklerin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 2'de

sunuldu. Tablo 2'de görüldüğü gibi *T.gondii* seropozitifliği dişilerde %62.34 (48/77) erkeklerde ise %52.38 (33/63) olarak belirlendi ve cinsiyet grupları arasında istatistikî bir fark ( $p>0.05$ ) belirlenmedi. *Toxoplasma gondii* seropozitifliği 3 yaşından büyük olanlarda %75.00 (33/44) ve 3 yaşından küçük olanlarda %50.00 (48/96) oranında saptandı ve bu durum istatistiksel olarak önemli ( $p<0.05$ ) bulundu.

**Tablo 2.** Köpeklerde SFDT ile saptanan *T.gondii* seropozitifliğinin ve antikor titrelerinin cinsiyet ve yaşa göre dağılımı

Cinsiyet/Yaş	Serum sayısı	Pozitif örnek sayısı	Pozitiflik yüzdesi (%)	Antikor Titrelemi			
				1/16	1/64	1/256	1/1024
Dişi*	77	48	62.34	29	17	3	1
Erkek*	63	33	52.38	18	8	5	-
≤3**	96	48	50.00	34	10	4	-
>3**	44	33	75.00	13	15	4	1
Total	140	81	57.86	47	25	8	1

p: 0.205\*, p: 0.005\*\*

## Tartışma ve Sonuç

Dünyada yaygın olarak köpeklerde ve insanlarda gözlenen listeriosis (27, 34) ve toxoplazmosis (16, 36) önemli zoonotik enfeksiyonlardır.

*Listeria monocytogenes* ile enfekte köpeklerde ateş, ishal ve kusma gibi klinik bulgularla karşılaşmaktadır. Listeriosisin tanısında CFT, IFAT, ELISA gibi serolojik testler kullanılmaktadır (27, 28). *Listeria monocytogenes*'in farklı serotipleri ve bazı gram

negatif ve gram pozitif bakteriler (*S.aureus*, *Streptococcus fecalis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* K8) arasında antijenik ilişki olması yanlış pozitif sonuçların oluşmasına neden olabilmektedir (29, 32). Çapraz reaksiyonların önlenmesi ile elde edilen aglütinasyon sonuçlarına dayanan Osebold yöntemi (27) listeriosisin tanısında kullanılan yöntemlerdendir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda *L.monocytogenes*'in seroprevalansının

%18.75 - %40.00 arasında olduğu bildirilmiştir (3, 7, 14, 19, 21).

Nevşehir ve Türkiye'nin diğer illerinde askeri köpeklerde *L.monocytogenes*'in seroprevalansı üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Ancak Türkiye'nin farklı bölgelerinde sokak ve barınak köpekleri üzerinde çeşitli serolojik çalışmalar yapılmıştır (3, 7, 14, 19, 21). İçen ve ark. (21) Diyarbakır yöresi sokak köpeklerinde listeriosis seropozitifliğini % 17, Babür ve ark. (7) Şanlıurfa yöresi sokak köpeklerinde %18.75, Gıcık ve ark. (19) Kars yöresi sokak köpeklerinde %22.3, Aktaş ve ark. (3) Erzurum yöresi barınak köpeklerinde %26.3 ve Ceylan ve ark. (14) ise Van yöresi sokak köpeklerinde bu oranı %40 olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada Nevşehir ilindeki 140 askeri köpekten elde edilen serum örneklerinde Osebold yöntemi kullanılarak %28.57 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Erzurum (3), Şanlıurfa (7), Van (14), Kars (19) ve Diyarbakır (21)'da yapılan çalışmalarda olduğu gibi sunulan bu çalışmada da yüksek oranda seropozitif sonuçların elde edilmesi ayrıca hastalığın zoonoz özellik taşıması sebebiyle, halk sağlığı açısından ülke genelinde konuyla ilgili kapsamlı araştırmaların yapılması gerekli görülmektedir.

Low ve Donachie (28), listeriosisün ılıman ve soğuk iklimlerde görülen bir enfeksiyon olduğunu bildirmektedirler. Nevşehir iline ait iklimin de ılıman ve soğuk olması bu görüşü destekler niteliktedir.

Low ve Donachie (28)'nin bildirdiğine göre ve Erzurum (3), Şanlıurfa (7), Kars (19) ve Diyarbakır (21) illerinde yapılan çalışmalarda, listeriosisün genellikle genç hayvanlarda görüldüğü belirtilmektedir. Sunulan çalışmada ise bildirilenlerin aksine üç yaşından büyük köpeklerde seropozitiflik yüksek oranda belirlenmiş ancak yaş grupları arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

*Listeria monocytogenes* seropozitifliği cinsiyete göre değerlendirildiğinde, Erzurum (3), Şanlıurfa (7) ve Kars (19) illerinde seropozitifliğinin dişilerde daha yüksek, Diyarbakır (21) yöresinde ise erkeklerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Sunulan çalışmada da seropozitifliğin dişilerdeki oranı erkeklerden daha yüksek bulunmuş ve bahsedilen çalışmalarda büyük çapta paralellik arzettiği belirlenmiştir.

*Toxoplasma gondii* insan ve hayvanlarda yaygın olarak gözlenen obligat hücre içi zorunlu bir protozondur (16). Çeşitli ülkelerde köpeklerde toxoplasmosisin seroepidemiolojik olarak araştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, %7.9 ile %76.4 arasında değişen pozitiflik oranları bildirilmiştir (4, 23, 26, 37). *Toxoplasma gondii* Türkiye'de ilk kez Akçay ve ark. (1) tarafından histopatolojik olarak tespit edilmiştir. *Toxoplasma gondii*'nin Türkiye'de ilk izolasyonu ise, Ekmen ve Altıntaş (17) tarafından gerçekleştirilmiştir. *Toxoplasma gondii*'nin teşhisinde CFT, IFAT, LAT, ELISA gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır (11, 30, 38). Bu çalışmada ise SF boya testi kullanılmıştır.

Türkiye'nin farklı bölgelerinde SF boya testi kullanılarak yapılan araştırmalarda %58 ile %97.5 arasında değişen oranlarda seropozitiflikler bildirilmiştir (2, 6-8, 19, 21, 24, 35). Sabin-Feldman boya testinden farklı serolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda ise %10 ile %85 arasında değişen seropozitifliklerin olduğu gösterilmiştir (13, 15, 33). Türkiye'de askeri birliklerde kullanılan köpekler üzerinde yapılmış fazla çalışma bulunmamaktadır. İnci ve ark. (22) Gemlik askeri harasındaki köpeklerde toxoplasmosisin seroprevalansını SF boya testi ile %68.7, Handemir ve ark. (20) IFAT ile %16.67, Ceylan ve ark. (13) Van ilindeki askeri köpeklerde ELISA ile %10 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada Nevşehir ilindeki askeri köpeklerde toxoplasmosisin seroprevalansı SF boya testi ile %57.86 olarak belirlenmiştir.

*Toxoplasma gondii* seropozitifliği cinsiyet gruplarına göre değerlendirildiğinde, Gemlik askeri harasındaki köpeklerde yapılan iki ayrı çalışmada seropozitiflik erkeklerde dişilerden daha yüksek oranda saptanmıştır (20, 22). Yine ülkemizin çeşitli illerinde sokak köpeklerinde yapılan çalışmalarda, Erzurum'da (9), erkeklerde dişilerden daha yüksek, Van (8) ve Aydın'da (18), dişilerde erkeklerden daha yüksek, Elazığ (2) ve Ankara'da (15) ise erkek ve dişilerde seropozitifliğin eşit oranda olduğu belirlenmiştir. Sunulan çalışmada ise dişilerdeki seropozitifliğin erkeklere göre daha yüksek oranda bulunmuş ancak cinsiyetler arasındaki bu farklılığın istatistikî olarak önemsiz olduğu ( $p>0.05$ ) tespit edilmiştir.

Toxoplasmosis ile yaş arasındaki ilişkiye bakıldığında; Gemlik askeri harasında farklı zamanlarda farklı serolojik testlerle yapılan iki ayrı çalışmada,

İnci ve ark. (22), SF boya testi ile en yüksek seropozitifliğin 3 ay ile 1 yaş grubunda olduğunu, Handemir ve ark. (20) ise IFAT ile en yüksek seropozitifliğin 5 yaş üstü köpeklerde olduğunu bildirmişlerdir. Sokak köpeklerinde ise, Ankara (6), Van (8), Erzurum (9), Kars (19) ve Diyarbakır (21) illerinde yapılan çalışmalarda seropozitifliğin ilerleyen yaşa bağlı yükseldiği, Şanlıurfa yöresinde (7) ise yaş ilerledikçe seropozitifliğin azaldığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada ise 3 yaş üstü köpeklerde seropozitifliğin yüksek olduğu bulunmuş ve yaş grupları arasındaki bu farklılığın istatistikî yönden önemli olduğu ( $p<0.05$ ) belirlenmiştir. Yine sunulan çalışmada yukarıdaki bildirimlerle büyük oranda paralel olarak seropozitifliğin yaş ilerledikçe arttığı tespit edilmiştir. İlerleyen yaşla beraber seroprevalansın artması, köpeklerin daha uzun süre çevresel kontaminasyona maruz kalmalarına bağlanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Nevşehir ilinde askeri birliklerde kullanılan köpeklerde, listeriosis ve toxoplasmosis seroprevalansının yüksek oranda olduğu ortaya konmuştur. Bu enfeksiyonların özellikle halk sağlığı açısından ciddi risk oluşturması bakımından hastalıkların önlenmesine yönelik gerekli tedbirlerin alınması kanaatine varılmıştır.

## Teşekkür

İstatistikî analizlerdeki katkılarından dolayı Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootehni Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Ömer ÇOBAN'a ve numunelerin sağlanmasındaki katkılarından dolayı sayın Dr. Armağan Erdem ÜTÜK'e teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Akçay S, Pamukcu, M, Baran S, (1950). *Bir köpekte ilk Toxoplasma observasyonu*. Vet Hekim Der Derg. 20, 245-254.
2. Aktaş M, Babür C, Karaer Z, Dumanlı N, Köroğlu E, (1998). *Elazığ'da sokak köpeklerinde toxoplasmosisin seroprevalansı*. Vet Bil Derg. 14, 47-50.
3. Aktaş MS, Özkanlar Y, Özkan AT, Babür C, Balkaya İ, (2010). *Erzurum ili barınak köpeklerinde listeriosis ve leishmaniasisin seroprevalansının araştırılması*. Türkiye Parazit Derg. 34,76 -80.
4. Ali CN, Harris JA, Watkins J D and Adesiyun AA, (2003). *Seroepidemiology of Toxoplasma gondii in dogs in Trinidad and Tobago*. Vet Parasitol. 113, 179-187,
5. Aoyagi, T, Sato Y, Matsuura S, Wada H, (2000). *Listeriosis in a racoon dog (Nyctereutes procyonides) associated with canine distemper*. J Vet Med Sci. 62, 639-641.
6. Aslantaş Ö, Özdemir V, Kılıç S, Babür C, (2005). *Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniasis among dogs in Ankara, Turkey*. Vet Parasitol. 129, 187-191.
7. Babür C, Altaş MG, Çelebi B, Sevgili M, Özkan AT, Gökçen A, (2007). *Şanlıurfa yöresi sokak köpeklerinde toxoplasmosis, leishmaniasis ve listeriosisün seroprevalansı*. Türk Hij Den Biyol Derg. 64, 11-16.
8. Babür C, Göz Y, Altuğ N, Özkan AT, Kılıç S, (2007). *Van ili köpeklerinde Sabin-Feldman Boya testi ile Toxoplasma gondii'nin seroprevalansı*. YYU Vet Fak Derg. 18, 1-4.
9. Balkaya İ, Aktas MS, Özkanlar Y, Babür C, Çelebi B, (2010). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii in dogs in Eastern Turkey*. Isr J Vet Med. 65, 58-61.
10. Borkü MK, Ural K, Gazyağcı S, Özkanlar Y, Babür C, Kılıç S, (2006). *Serological detection of listeriosis at a farm*. Turk J Vet Anim Sci. 30, 279-282.
11. Carlier Y, Bout D, Dessaint JP, Capron A, VanKnepen F, Ruitenberg EJ, Bergquist R, and Huld G, (1980). *Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of Toxoplasmosis*. Bullertin WHO. 58, 99-105.
12. Cengiz AT, (1999). *Listeria ve Erysipelothrix*. Ustaçelebi Ş. eds. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi, Ankara. p. 404.
13. Ceylan E, Berktaş M, Ağaoğlu Z, (2001). *Van'da askeri köpeklerde Toxoplasma gondii seroprevalansı*. Türkiye Parazit Derg. 25, 332-334.
14. Ceylan E, Karaca M, Akkan HA, Keleş İ, Kutlu İ, (2005). *Van yöresi sokak köpeklerinde listeriosis seroprevalansı*. Y Y Ü Sağlık Bil Derg. 8, 15-17.
15. Çakmak A, Karaer Z, Bıykoğlu G, Babür C, Pişkin FC, (1996). *Ankara'da sokak köpeklerinde toxoplasmosis seroprevalansı*. Fırat Üniv Sağlık Bil Derg.10, 279-282.
16. Dubey JP, (2008). *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second Edition, CRC Press. Boca Raton, New York. p. 161-167.
17. Ekmen H, Altıntaş K, (1973). *Bir köpekte Toxoplasma izolmanı*. Türk Hij Den Biyol Derg. 33, 17-20.
18. Eren H, Babür C, Özlem, MB, Durukan A, Ulutaş B, (1998). *Aydın ili kedi ve köpeklerinde anti-T.gondii antikorlarının Sabin-Feldman Boya testi ile araştırılması*. Bornova Vet Kont Araş Enst Derg. 37, 23-28.
19. Gıcık Y, Sarı B, Babür C, Çelebi B, (2010). *Kars yöresinde köpeklerde Toxoplasma gondii ve Listeria monocytogenes'in seropozitifliği*. Türkiye Parazit Derg. 34, 86-90.
20. Handemir E, Çam Y, Şenlik B, Kamburgil K, Kırmızı E, (2001). *Askeri köpeklerde Toxoplasmosis seroprevalansı*. Türkiye Parazit Derg. 25, 13-17.
21. İcen H, Babür C, Bademkiran S, Çelebi B, Şimsek A, Özyurtlu N, Özkan AT, (2010). *Diyarbakır bölgesindeki sahipsiz köpeklerde toxoplasmosis, leishmaniasis ve listeriosisün seroprevalansı*. Türkiye Parazit Derg. 34, 6-10.
22. İnci A, Babür C, Kalımbacak A, (1996). *Gemlik askeri harası köpeklerinde anti-T.gondii antikorlarının Sabin-Feld-*

- man boya testi ile araştırılması. Türkiye Parazitolojisi Derg. 20, 413-416.
23. Jadoon A, Akhtar T, Maqbool A, Anjum A A and Ajmal A, (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in canines. J Anim Plant Sci. 19, 179-18.
  24. Kılıç S, Babür C, Taylan AÖ, Mamak N, (2008). Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Leishmania infantum* antibodies among Sivas Kangal dogs. Turk J Vet Anim Sci. 32, 299-304.
  25. Kocabiyyık AL, Çetin C, (2005). Fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in stray dogs in Bursa province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 29, 1357-1359.
  26. Lindsay DS, Dubey JP, Buther JM, Blagburn BL, (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. Vet Parasitol. 73, 27-33.
  27. Low JC, Davies RC and Donachie W, (1992). Purification of listeriolysin-O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infections in sheep. J Clin Microbiol. 30, 2705-2708.
  28. Low JC, Donachie W, (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J. 153, 9-29.
  29. Osebold JW, Aalund O, Crisp CE, (1965). Chemical and immunological composition of surface structures of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol. 89, 84-88.
  30. Öncel T, Handemir E, Kamburgil K and Yurtalan S, (2007). Determination of seropositivity for *Toxoplasma gondii* in stray dogs in Istanbul, Turkey. Revue Méd Vét. 158, 223-228.
  31. Sabin AB and Feldman HA, (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Sciences. 108, 660-663,
  32. Seeliger HPR, Sulzbacher F, (1956). Antigenic relationships between *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Can J Microbiol. 2, 220-231.
  33. Sevinç F, Dik B, Babür C, Kamburgil K, Uslu U, (2000). Konya sokak köpeklerinde *Toxoplasma gondii*'nin Sabin-Feldman Boya testi, Indirekt Fluoresan Antikor testi ve Modifiye Aglutinasyon testi ile seroprevalansı. Türkiye Parazitolojisi Derg. 24, 61-64.
  34. Şahin M, (2007). Türkiye'de listeriyozun hayvanlardaki durumu. 1. Ulusal Zoonoz Kongresi, 3-6 Aralık, Erzurum-Türkiye.
  35. Şimşek S, Ütük AE, Babür C, Köroğlu E, (2006). Kocaeli yöresi köpeklerinde *Toxoplasma gondii* seroprevalansı. Türkiye Parazitolojisi Derg. 30, 171-174.
  36. Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM, (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. Int J Parasitol. 30, 1217-1258.
  37. Tsai YJ, Chung WC, Fei ACY, Hong CL, Tsai YY, Peng S, Wu YL, (2008). Prevalance of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray dogs in Taipei, Taiwan. J Parasitol. 94, 1437.
  38. Watson ADJ, Farrow BRH and Donald PJ, (1982). Prevalance of *Toxoplasma gondii* antibodies in pet dogs and cats. Aust Vet J. 58, 213-214.

## Köpeklerde Babesiosis

Nuran AYSUL

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın

Geliş Tarihi / Received: 14.10.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 16.12.2011

**Özet:** Köpeklerde babesiosis, kenelerle bulaşan *Babesia canis* ve *Babesia gibsoni*'nin sebep olduğu protozoer bir hastalıktır. Parazitler eritrositleri enfekte eder ve tipik olarak hemolitik anemi yaparlar. *B.canis* büyük babesialar grubundan olup *B.canis canis*, *B.canis rossi* ve *B.canis vogeli* olmak üzere üç alt türü vardır. Morfolojik olarak aynı görünmelerine rağmen, vektörleri, (sırasıyla *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis laechei* ve *Rhipicephalus sanguineus*), coğrafik yayılışları, antijenik yapıları ve köpeklerde patojeniteleri farklıdır. *B.gibsoni* enfeksiyonları genel olarak *B.canis*'den daha şiddetli klinik semptomlara ve organ yetmezliklerine sebep olurlar. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar ile köpeklerin büyük ve küçük *Babesia* etkenlerinin kabul edildiğinden daha fazla olduğu bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Babesiosis, köpek.

### Canine Babesiosis

**Summary:** Canine babesiosis is a tick-borne disease caused by the protozoal parasites *Babesia gibsoni* and *Babesia canis*. These parasites infect the red blood cells of dogs and typically cause hemolytic anemia. *B.canis* belongs to large babesias and is classified in three subspecies *B.canis canis*, *B.canis rossi* and *B.canis vogeli*. Although they share a similar morphology, they have different vector specificity (*Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis laechei* and *Rhipicephalus sanguineus* respectively), geographical distribution, antigenicity and pathogenicity to dogs. Infection with *B.gibsoni* generally results in more severe clinical manifestations than infection with *B.canis*, and may cause multiple organ dysfunctions. In recent years molecular studies it was found small and large babesias in dogs are more than adopted.

**Key words:** Babesiosis, dog.

### Giriş

Babesiosis, *Babesia* cinsindeki protozoonlar tarafından evcil ve yabani omurgalı hayvanlarda oluşturulan, yüksek ateş, intravasküler hemoliz, hemolitik anemi ve hemoglobinuri ile karakterize, perakut, akut veya subklinik seyirli kenelerle bulaşan bir enfeksiyondur (8). Bu protozoonlar sınıflandırmada Apikompleksa şubesi, Piroplasmida dizisinde yer alırlar. Evcil ve yabani hayvanlarda bilinen 100'den fazla *Babesia* türünden *Babesia canis* ve *B.gibsoni* (25), *B.conradae* (23) ve *B.microti*-like (*Theileria annae* veya İspanya izolatu) (41) köpeklerde enfeksiyon oluşturmaktadır. Babesiosis köpekler arasında *Ixodidae* ailesine bağlı kene türleri ile nakledilmektedir (25). Bununla birlikte *B.gibsoni*'nin kan transfüzyonu ve köpeklerin birbirlerini ısırması ile de bulaştığı bildirilmiştir (7).

*Babesia canis* morfolojik olarak 3-5 µm büyüklüğünde olup büyük *Babesia*'lar grubundadır. Ancak *B.canis* coğrafik, patojenite, antijenik yapı

ve vektör farklılıklarının yanında son yıllarda ortaya konan genetik yapılarındaki farklılıklarından dolayı *B.canis canis*, *B.canis vogeli*, *B.canis rossi* olmak üzere üç farklı alt türe ayrılmıştır (11,37,40). Ayrıca Kuzey Karolina'da klinik olarak babesiosis semptomları gösteren bir köpekte mikroskopik incelemede büyük *Babesia* etkenlerine rastlanmış, ancak mikroskoptaki bu parazitlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirilmesinde bilinen *Babesia* etkenlerinden farklı bir genetik yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. Henüz isimlendirilmemiş son bulunan bu *Babesia* ile birlikte köpeklerde dört büyük *Babesia* etkeni bulunduğu kabul edilmektedir (6).

*Babesia gibsoni* morfolojik olarak 1-3 µm büyüklüğünde olup küçük *Babesia*'lar grubundadır. *Babesia gibsoni* mikroskopik incelemede morfolojik olarak köpeklerin tek küçük *Babesia* etkeni olarak bilinmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar *B.gibsoni* (Asya izolatu) (12), *B.conradae* (23), *B.microti-like* (41) (*T. annae* veya

İspanya izolatu) olmak üzere köpeklerde klinik ve genetik olarak farklı üç küçük *Babesia* olduğunu göstermiştir. Normalde tek turnaklıların küçük piroplazmi olan *B.equi* (*T.equi*) de moleküler olarak köpeklerde bulunmuştur. Ancak köpeklerdeki yaşam çemberi, klinik bulguları, intra ve extraeritrositik durumları belirlenmemiş olup, bunun bir laboratuvar kontaminasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı henüz netlik kazanmamıştır (13).

Köpeklerde babesiosis etkenlerinin dünyada yayılışı vektör kenelerin yayılışına bağlı olarak tropik, subtropik ve ılıman iklim kuşağıdır (33). *Babesia canis canis*, *Dermacentor* cinsi kenelerle bulaşmakta ve Avrupa'da yayılış göstermektedir. *Babesia canis vogeli*, *Rhipicephalus sanguineus*

ile bulaşmakta ve Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası, tropik ve subtropik iklim kuşağında görülmektedir. *Babesia canis. rossi* ise *Haemaphysalis elliptica* (*H.leachi*) ile bulaşır ve Afrika'da görülmektedir. *Babesia gibsoni*, *Haemaphysalis* spp. ve *R.sanguineus* ile taşınmakta olup Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde görülmektedir (Tablo 1) (20). *Babesia gibsoni*, son on yıldır Asya izolatu dışında diğer ülkelerde de varlığı bildirilmiş, özellikle Amerikan Pit Bull Terrier gibi kavgacı köpeklerde sıklıkla görülmüştür. Enfekte köpekler diğerleri için bölgede vektör keneler olmasa bile taşıyıcı durumdadırlar ve gelecekte özellikle yasal olmayan köpek dövüşleri yapılan ülkelerde artacağı düşünülmektedir (29).

**Tablo 1:** Köpeklerde bulunan *Babesia* türleri, vektörleri ve yayılışları

Büyükklük	Tür	Vektör	Coğrafik yayılış
Büyük	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Tropik, subtropik ve Akdeniz Havzası
	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor</i> spp.	Avrupa
	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i>	Afrika, Güney Afrika
	İsmlendirilmemiş büyük <i>Babesia</i> sp. Kuzey Karolina izolatu	Bilinmiyor	Kuzey Karolina
Küçük	<i>Babesia gibsoni</i> Asya izolatu	<i>Haemaphysalis longicornis</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Asya
	<i>Babesia microti</i> -benzeri İspanya izolatu	<i>Ixodes hexagonus</i>	İspanya, Portekiz
	<i>Babesia equi/Theileria equi</i>	Bilinmiyor	Afrika, Avrupa, Asya
	<i>Babesia conradae</i>	Bilinmiyor	Batı Amerika

Türkiye'de köpek babesiosisi ile ilgili ilk çalışma ise, Merdivenci'ye (31) göre, Ankara'da *Piroplasma canis*'in mikroskopik olarak bulunduğunu bildiren Gören ve Yetkin (17) tarafından yapılmıştır. 1961 yılında Ankara'da bir köpekte (32) ve 2003 yılında Aydın ilinde iki köpekte *B.canis*'in varlığı mikroskopik olarak bildirilmiştir (38). Daha sonra Aydın ilinde klinik babesiosis semptomları bulunan 7 köpekte *B.canis* PCR ile saptanmıştır (39). Ege bölgesinde PCR ile yapılan bir çalışmada, 383 köpeğin 40'ında *B.c.vogeli* bulunmuştur (22). İstanbul ilinde üç köpekte mikroskopik olarak görülen büyük *Babesia* etkenleri PCR-RFLP yöntemi ile *B.c.vogeli* olarak tanımlanmıştır (18). İstanbul ilinde 483 köpek üzerinde PCR-RLB ile yapılan bir başka çalışmada ise 19 köpekte *B.c.vogeli* bulunmuştur (3).

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları kliniğine yüksek ateş ve halsizlik şikayetleri ile getirilen Staffordshire Terrier cinsi 3,5 yaşlı erkek bir köpeğin kanının mikroskopik incelenmesinde eritrositler içindeki küçük piroplazmlar PCR ile incelenmesi sonucu *B.gibsoni* olarak teşhis edilmiştir (4).

Köpeklerde babesiosisin teşhisinde mikroskopik, serolojik ve moleküler metotlar kullanılmaktadır. Mikroskopik teşhis, kliniklerde hala en basit ve en güvenilir yöntem olarak kullanılmakta olup hastalığın akut döneminde Giemsa veya Wright's boyama teknikleri ile eritrosit içindeki protozoonlar X1000 büyütmede görülebilmektedir (35). Büyük ve küçük *Babesia* etkenleri mikroskopik olarak bü-

yüklüklerinin farklı olmasından dolayı ayırt edilebilmekte ancak mikroskopik teşhis ile alt tür tayini yapılamamaktadır. Mikroskopik teşhiste incelenen kanın kulak veya kuyruk ucundan alınması veya alınan kandan buffycoat tabakası ayrılarak incelenmesi protozoonların görülmesi şansını artırabilmektedir (19). Kronik olarak enfekte veya taşıyıcı köpeklerde parasiteminin düşük olması ve klinik bulguların belirgin olmamasından dolayı mikroskopik teşhis zordur. *Babesia gibsoni*'nin oluşturduğu enfeksiyonlarında köpek sahiplerine köpeğin 4-8 hafta içinde başka bir köpek tarafından ısırılıp ısırılmadığı sorulmalıdır (7).

PCR, yüksek sensitivite ve spesifitesinden dolayı epidemiyolojik ve filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen hala sınırlı sayıda laboratuarda rutin olarak klinik babesiosisin teşhisinde kullanılmaktadır. PCR ile tanı çalışmaları ribozomal RNA genlerinden 18S, 5.8S, 28S ve ITS geni ve ayrıca p18/BgTRAP gibi diğer gen bölgelerinden seçilen spesifik primerler kullanılarak yapılmıştır (6,14,20,40). Köpek *Babesia*'larının tür tayinlerinin yapılmasında PCR-RFLP ve nested PCR da kullanılmaktadır (5, 21, 40). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) *B.gibsoni*'nin teşhisinde güvenilir ve hızlı moleküler teşhis olarak bildirilmiştir (20). Reverse Line Blotting (RLB) hibridizasyon ise kenelerle bulaşan kan protozoonlarının epidemiyolojik çalışmalarında kullanılmaktadır ve köpeklerde babesiosis etkenlerinin ayırımında da kullanılmıştır (3, 15, 28). Quantitative PCR (qPCR) deneysel olarak *B.gibsoni* ile enfekte üç köpekte uygulanmış, aşı ve tedavi çalışmalarında immunolojik yanıtın izlenmesi için kullanılabilirliği düşünülmüştür (29).

Mikroskopik teşhis ile %0.001 parazitemili (yaklaşık 60 parazit/µl) köpeklerde etkenler görülebilirken, bu oran PCR ile 0,05-9 parazit/ µl kan (5,29) tespitine kadar çıkabilmektedir. PCR, yüksek sensitivitesine rağmen alınan örneklerden parazit DNAsı izole edilemezse enfeksiyonu tespit edememektedir. Polimeraz zincir reaksiyonunun belirleme düzeyi (detection limit)'den daha düşük parazitemiler, özellikle kan verici köpekler bakımından büyük handikaplar oluşturmaktadır (6). Indirect floresan antibody test (IFAT) otuz yıldır köpeklerde babesiosisin teşhisinde tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 26). Ancak *Babesia*'ların hem kendi arasındaki, hem de diğer Apikompleksa şubesindeki diğer parazitler ve hatta konak hücreleri ile araların-

da oluşabilen çapraz bağışıklıktan dolayı sensitivitesi oldukça düşüktür (1). ELISA testi Japonya'da gelecekteki aşı çalışmalarında kullanılmak üzere özellikle *B.gibsoni*'nin teşhisinde sıklıkla kullanılmaktadır. ELISA testinde en çok rBgP50,rBgSA1, rBgP32 ve BgTRAP rekombinat antijenleri kullanılmaktadır (16, 24).

Köpeklerde babesiosisin patogenezinin şiddeti subklinik enfeksiyondan, orta şiddette anemi ve organ yetmezlikleri sonucu ölüme kadar değişebilmektedir. Patogenezdaki bu değişiklik başta parazitin türü olmak üzere konağın yaşı, bağışıklık durumu, eş zamanlı oluşan enfeksiyonlara bağlıdır. Köpeklerdeki küçük ve büyük bütün *Babesia* türleri ateş, anoreksi, splenomegali, anemi ve trombositopeniye sebep olabilirler. Parazitler direk olarak eritrositleri yıkımlayabildikleri gibi enfekte eritrositlerin geçirgenliğini artırarak, oksidatif ve sekonder bağışıklığa bağlı eritrositlerin yıkımlanması sonucu intra ve ekstravasküler hemoliz oluşturlar (27). Köpeklerin büyük *Babesia*'ları içinde en az patojen olan alt tür *B.c.vogeli*, en patojen alt tür ise Afrika'da görülen *B.c.rossi* dir (19, 36). *Babesia canis rossi* ile enfekte köpeklerde, hepatopati ve hemolize bağlı bozukluklar sonucu bazı komplikasyonlar gelişebilmekte, komplikasyonların tedavisi ancak erken dönemde teşhis ile mümkün olabilmektedir (9). *Babesia canis vogeli* çoğunlukla subklinik seyrederek ve çoğunlukla herhangi bir tedavi uygulanmadan iyileşmekte ancak 3-4 aylık köpek yavrularında öldürücü olabilmektedir. *Babesia canis vogeli* çoğunlukla immun sistemi baskılayıcı tedavi uygulanan köpeklerde ve diğer enfeksiyonlarla birlikte seyrederek. *Babesia canis canis*, *B.gibsoni*, *T. annae* ve *B.conradae* ile oluşan enfeksiyonların şiddeti ise çoğunlukla konağın bireysel özelliklerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (27). *Babesia conradae*, *B.gibsoni*'den daha patojenik olup, *B. conradae*'den ileri gelen enfeksiyonlarında daha fazla parazitemi ve daha şiddetli anemi gözlemlenir (23). *T.annae* enfeksiyonlarında ise şiddetli anemi ile birlikte azotemi gözlemlenmiştir (10).

Köpeklerde babesiosisin tedavisinde en çok İmidocarb dipropionate ve Diminazine acetate kullanılmalarına rağmen Quinuronium sulphate, Trypane blue, Pentamidine, Phenamidine ve Parvaquone ile yapılan tedavilerde de klinik bulguların azaldığı ve hastada iyileşme gözlemlendiği bildirilmiştir (30). *Babesia gibsoni* enfeksiyonlarında çoğunlukla

Clindamycin ve Metronidazole kombinasyonları kullanılmaktadır. *Babesia gibsoni* ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde ilaçlara daha geç cevap alınmaktadır (21). Antibabesial ilaçlar, büyük *Babesia* türlerinin eliminasyonunu kolayca sağlarken küçük *Babesia*'lara karşı (*B.gibsoni*) her ne kadar klinik iyileşme sağlasalar da parazitleri tam olarak elimine edemezler. Bu nedenle *B.gibsoni* enfeksiyonlarında nüksler gözlenmektedir (30).

Korunmada esas köpeklerin kenelerden korunmasıdır. Bu amaçla, özellikle yaz aylarında topikal uzun etkili akarisit uygulamaları (fipronil, selamectin veya bunların permethrin veya IGR preparatları ile kombinasyonları) veya kene tasmaları (amitraz, propoxur deltamethrin veya permethrin içeren) kullanılmalıdır (30). Ayrıca Fransa'da inaktif *B.c.canis*'den hazırlanan bir aşı Pirodox® adı ile piyasaya sürülmüştür ancak henüz ülkemizde kullanılmamaktadır. Bu aşı enfeksiyon oluşmasını engellemese de klinik semptomları önlemektedir. Ancak aşının *B.canis*'in diğer alt türlerine ve *B.gibsoni*'ye karşı koruyucu etkisi yoktur (30). Hollanda'da Nobivac piro® adı ile piyasaya sürülen bir aşı da köpeklerde *B.c.canis* ve *B.c.rossi* SPA'larının kombinasyonları ile daha kapsamlı bir korunma sağlamayı amaç edinmiştir (34).

## Sonuç

Sonuç olarak büyük *Babesia*'lardan *B.canis*, küçük *Babesia*'lardan *B.gibsoni* esas olarak köpeklerde babesiosise neden olurken son yıllarda yapılan çalışmalarla bu etkenlerin kendi aralarında da alt gruplara ayrıldıkları, ayrıca yeni büyük ve küçük *Babesia* türleri de bildirilmiştir. Türkiye'de ise büyük *Babesia*'larından *B.c.vogeli*, küçük *Babesia*'lardan ise *B.gibsoni* (Asya izolatu) köpeklerde bulunmuştur.

## Kaynaklar

1. Aboge GO, Jia H, Terkawi MA, Goo Y, Kuriki K, Nishikawa Y, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X, (2007). A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol. 149, 85-94.
2. Anderson JF, Magnarelli LA, Sulzer AJ, (1980). Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. Am J Vet Res. 41, 2102-2105.
3. Aysul N, (2006). İstanbul ili köpeklerinde bulunan *Babesia* türlerinin teşhisinde mikroskopik ve PCR-RLB bulgularının karşılaştırılması. Doktora Tezi, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
4. Aysul N, Ural K, Ulutaş B, Eren H, Karagenç T, (2009). Aydın ilinde bir köpekte *Babesia gibsoni* olgusu. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi Poster bildirisi. Adana.
5. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB, (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol. 41, 72-77.
6. Birkenheuer AJ, Neel J, Ruslander D, Levy MG, Breitschwerdt EB, (2004). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. Vet Parasitol. 124, 151-160.
7. Birkenheuer AJ, Correa MT, Levy MG, Breitschwerdt EB, (2005). Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). J Am Vet Med Assoc. 227, 942-947.
8. Blood DC, Otto MR, Gay CC, Radostits OM, (1994). A Textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 7nd ed. London: Veterinary Medicine Bailliere Tindall.
9. Böhm M, Leisewitz AL, Thompson PN, Schoeman JP, (2006). Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. Vet Parasitol. 141, 18-29.
10. Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Goethert HK, Telford III SR, Spielman A, (2004). Azotaemia and mortality among *Babesia-microti*-like infected dogs. J Vet Int Med. 18, 141-146.
11. Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Precigout E, Moubri K, Schettters PT, Gorenflot A, (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. J Eukaryot Microbiol. 46, 298-303.
12. Conrad P, Thomford J, Yamane I, Whiting J, Bomsa L, Uno T, Holshuh HJ, Shelly S, (1991). Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. J Am Vet Med Assoc. 199, 601-605.
13. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC, (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. Vet Parasitol. 113, 189-201.
14. Fukumoto S, Xuan X, Shigeno S, Kimbita E, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T, (2001). Development of a polymerase chain reaction methods for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. J Vet Med Sci. 63, 977-981.
15. Georges K, Ezeokoli CD, Newaj-Fyzul A, Campbell M, Mootoo N, Mutani A, Sparagano OAE, (2008). The application of PCR and reverse line blot hybridization to detect arthropod-borne haemopathogens of dogs and cats in Trinidad. Ann N Y Acad Sci. 1149, 196-199.

16. Goo Y, Jia H, Aboge GO, Terkawi MA, Kuriki K, Nakamura C, Kumagai A, Zhou J, Lee EG, Nishikawa Y, (2008). *Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. Exp Parasitol. 118, 555-560.
17. Gören S, Yetkin R, (1935). *Tekturnaklıda, sığırdada, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz*. M.M.B. Bakt. Evi Yayını. Ulus Basımevi, Ankara. 104 s.
18. Gülanber A, Gorenflot A, Schetters TP, Carcy B, (2006). *First molecular diagnosis of Babesia vogeli in domestic dogs from Turkey*. Vet Parasitol. 139, 224-230.
19. Irwin PJ, Hutchinson GW, (1991). *Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs*. Aust Vet J: 68, 204-209.
20. Irwin PJ, (2009). *Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control*. Parasites and Vectors. Erişim adresi: (<http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S4>) Erişim tarihi: 27. 03. 2009.
21. Jefferies R, Ryan U, Irwin P, (2007). *PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies*. Vet Parasitol. 144, 20-27.
22. Kırılı G, (2006). *Ege Bölgesi'nde köpek Babesiosis'inin yaygınlığı*. Yüksek Lisans Tezi ADÜ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
23. Kjemtrup AM, Wainwright K, Miller M, Penzhorn BL, Carreno RA, (2006). *Babesia conradae, sp. nov., a small canine Babesia identified in California*. Vet Parasitol. 138, 103-111.
24. Konishi K, Sakata Y, Miyazaki N, Jia H, Goo YK, Xuan X, Inokuma H, (2008). *Epidemiological survey of Babesia gibsoni infection in dogs in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay using B.gibsoni thrombospondin-related adhesive protein antigen*. Vet Parasitol. 155, 204-208.
25. Kuttler KL, (1988). *World-wide impact of babesiosis*. Ristic, M. eds. Babesiosis of Domestic Animals and Man. CRC Press. Florida. p.163-189.
26. Levy MG, Breitschwerdt EB, Moncol DJ, (1987). *Antibody activity to Babesia canis in dogs in North Carolina*. Am J Vet Res. 48, 339-341.
27. Lobetti RG, (1998). *Canine babesiosis*. Comp Cont Ed Pract Vet. 20, 418-431.
28. Matjila PT, Leisewitz AL, Ooshuizen MC, Jongejan F, Penzhorn B, (2008). *Detection of a Theileria species in dogs in South Africa*. Vet Parasitol. 157, 34-40.
29. Matsuo A, Ono S, Ikadai H, Uchide T, Imamura S, Onuma M, Okanao S, Higuchi S, (2005). *Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of Babesia gibsoni (Asian genotype) DNA*. J Vet Diagn Invest. 17, 569-573.
30. Melhorn H, (2001). *Encyclopedic reference of parasitology. Diseases, Treatment, Therapy*. Erişim adresi: <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/frame.php> Erişim tarihi: 05.04.2006.
31. Merdivenci A, (1970). *Türkiye parazitleri ve parazitolojik yayınları*. Kutulmuş Matbaası, İstanbul. 322.
32. Özcan CH, (1961). *Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen piroplazmoz vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Yay., 143, Çalışmalar: 83, Ankara.
33. Quinn PJ, Donnelly WJC, Carter ME, Markey BKJ, Torgerson PR, Breathnach RMS, eds., (1997). *Microbial and parasitic diseases of the dog and cat*. First edition. London: Saunders Press, p.211.
34. Schetters TP, Kleuskens J, Carcy B, Gorenflot A, Vermeulen A, (2007). *Vaccination against large Babesia species from dogs*. Prassitologia. 49, 13-17.
35. Soulsby E JL, (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 7 th ed London. Bailliere Tindall,
36. Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T, (2008). *Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease*. Vet Parasitol. 157, 211-221.
37. Uilenberg G, Franseen FFJ, Perie NM, Perie M, Spanjer AAM, (1989). *Three groups of Babesia canis distinguished and a proposal for nomenclature*. Vet Q. 11, 33-40.
38. Ulutaş B, Paşa S, Karagenc T, Bayramlı G, (2003). *Atipik babesiosisli iki köpekte klinik görüntüm*. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi. 5. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi. Poster Bildirisi. 165.
39. Ulutaş B, Bayramlı G, Ulutaş PA, Karagenc T, (2005). *Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine Babesiosis: A preliminary study*. Vet Clin Pathol. 34, 144-147.
40. Zahler ME, Schein H, Rinder R, Gothe, (1998). *Characteristic genotypes discriminate between Babesia canis isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs*. Parasitol Res. 84, 544-548.
41. Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R, (2000). *Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs*. Vet Parasitol. 89, 241-248.

## **Salmonella patojenite adaları (1-10)**

**Elçin GÜNAYDIN, Selahattin ŞEN**

*Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara*

Geliş Tarihi / Received: 24.10.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 19.12.2011

**Özet:** Patojenite adaları üzerinde lokalize olan virulens genleri, *Salmonella enterica* infeksiyonlarının patogenezisinde, çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu patojenite adalarının yapısı, fonksiyonu, *Salmonella* serovarları arasındaki dağılımı, belirgin bir farklılık gösterse de, *Salmonella* patojenite adaları arasında birçok ortak motif vardır. Günümüze kadar tanımlanmış toplam 16 adet *Salmonella* patojenite adası mevcuttur. Bu derlemede, bunlardan sadece 10 patojenite adasına değinilmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Salmonella*, patojenite adası

### **Salmonella pathogenicity islands (1-10)**

**Summary:** Virulence genes located on pathogenicity islands play a crucial role in the pathogenesis of *Salmonella enterica* infections. Although the structure, function and distribution of these pathogenicity islands among *Salmonella* serovars show markedly difference, several common motifs are present among *Salmonella* pathogenicity islands. Currently, identified total 16 *Salmonella* pathogenicity islands are present. In this review, of them all, 10 pathogenicity islands are mentioned.

**Key words:** *Salmonella*, pathogenicity islands

### **Giriş**

*Salmonella* infeksiyonları kompleks bir patogenezis sergilerler. *Salmonella* genellikle kontamine gıdaların tüketimi ile vücuda alınır. Çeşitli fimbrial adhezinler, *Salmonella* spp.'nin konak hücre ile temasını başlatır. Bakteri-konak hücrelerinin ilk etkileşimi, intestinal mukozanın epiteliyal hücreleri gibi, non-fagositik hücrelere invazyondur. *Salmonella enterica*, aynı zamanda fagositoza karşı direnen, infekte hücrede fagolizozom içerisinde proliferere olabilen, fakültatif intrasellüler bir patojendir.

Patojenite adaları, çok sayıda patojenin kromozomu üzerinde bulunan genetik elementlerdir (1) ve bakteriyel evrimde 'kuantum sıçraması' olarak kabul edilmektedirler (2). Patojenite adalarının horizontal gen transferi ile kazanımı, bakterinin diğer türlerden hızlı bir şekilde, kompleks virulens fonksiyonu kazanmasını olanaklı hale getirir. Patojenite adaları, yapılarında ve fonksiyonlarında farklılık gösterse de, birçok ortak özellikleri de mevcuttur. Patojenite adalarının alt kümeleri genetik olarak stabil değildir ve integraz, transpozon, direkt tekrarlar, bakteriyofaj genleri gibi DNA mobilitesi ile alakalı sekanslar patojenite adaları içerisinde tespit edilebilir.

*Salmonella enterica*'nın birçok virulens fenotipi, patojenite adaları üzerindeki genler tarafından kodlanır. *Salmonella* patojenite adaları, konak hücrelerine invazyon, intrasellüler patogenezis gibi birçok göze çarpan virulens fenotipini barındırırlar. Günümüzde karakterize ve tanımlanmış toplam 17 adet *Salmonella* patojenite adasının varlığı bildirilmiştir. Bazı *Salmonella* patojenite adaları, tüm *Salmonella* genusunda mevcutken, bazıları da sadece belirli serovarlar için spesifiktir.

Bu derlemede, 16 *Salmonella* patojenite adasının, ilk 10'unun özellikleri, evrimsel durumları, serovarlar arasında dağılımı ve patogenezis üzerinde rolleri konusunda bilgiler verilmektedir.

**Salmonella Patojenite Adası-1 (SPA-1):** *Salmonella* patojenite adaları içinde en iyi karakterize edilen patojenite adasıdır. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (*Salmonella* Typhimurium) kromozomunun üzerinde 63. sentisomda lokalize olan SPA-1, 42 kb büyüklüğündedir. G+C içeriği %42'dir (3, 4). Tip III Sekresyon Sisteminin çeşitli komponentleri, regülatör proteinleri ve salgısal efektör proteinleri kodlayan en az 29 gen içerir (5). SPA-1'in, *Salmonella* Typhimurium'un intesti-

nal epitele penetre olmasını olanaklı hale getirdiği, SPA-1 mutantlarının farelere oral inokule edildiğinde attenüe olması, fakat sistemik olarak attenüasyona uğramaması ile kanıtlanmıştır (3). Bu sonuç; *Salmonella enterica* evriminin erken dönemlerinde kazanılan rolünün barsak kolonizasyonu ile sınırlı kaldığını ve diğer virulens determinanatlarının sistemik infeksiyonların gelişmesini olanaklı hale getirmek için sonradan kazanıldığını göstermektedir (3, 6).

SPA-1'in etkisini göstermesi 3 faktöre bağlıdır:

1. İntestinal epitelin nonfagositik hücrelerine invazyon
2. Makrofajların apoptosisi
3. İnvazyonu takiben epitelyum hücrelerinde erken zamanda hızlı replikasyon

Ancak bu 3 şartın kombine olması durumunda *Salmonella* spp. infekte hayvanların barsağında kendi boşluğunu yaratıp etkili olabilir. Adhezinler tarafından intestinal yüzeyin tanınması *Salmonella* serovarlarının konağa adaptasyonuna yardımcıdır. Konağa adaptasyonda nonfimbrial adhezinler görev yapar. Nonfimbrial adhezinleri *invH* kodlar. *invH* geni, *Salmonella enterica*'da SPA-1 içinde bulunan bir genidir. SPA-1'de kodlanan ve Tip III Sekresyon Sisteminin bir parçası olan 2 gen; *invA* ve *invE* invazyonda görevlidir (7). SPA-1'de sekresyonu regüle eden ana faktör, kültür ortamının pH'sının asitten alkaliye değişmesidir. Oral sindirimden sonra bakteri asidik ortam olan mideden alkali ortam olan barsağa geçince infeksiyona neden olur. İnvazyonu başlatan *Salmonella* spp.'de transloke olan efektör proteinlerdir; *invA*, *orgA*, *sptP*, *sipA*, *sipB*, *sipC* ve *sopE* (3, 8, 9).

***Salmonella* Patojenite Adası-2 (SPA-2):** Bu patojenite adası, *valV* tRNA geninin bitişiğine sokulmuş 40 kb'lık bir lokustur (10). SPA-2, en az 2 farklı elemandan oluşmuştur (11). Sadece *Salmonella enterica*'da bulunan 25 kb'lık ve toplam G+C içeriği %43 olan kısım, sistemik patogenezi sorumludur. Bu kısım, *Salmonella enterica*'da, intrasellüler bakteri tarafından aktive edilen, Tip III Sekresyon Sistemini kodlar. SPA-2'nin bir diğer bölümü, 15 kb büyüklüğündedir ve hem *Salmonella bongori* hem de *Salmonella enterica*'da tespit edilmiştir. G+C içeriği %54 olan bu bölüm, sistemik virulens sorumluluğunun yanı sıra anaerobik respirasyonda

önemli olan tetrathionate reductase enzimini kodlar (12). SPA-2, *Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum*'un patogenezi için önemli bir virulens faktörüdür. Özellikle makrofajlar içinde hayatta kalma, dalak ve karaciğerde üremeden sorumludur. Hücreler arası alışverişi, *Salmonella* spp. içeren makrofajlarda fagolizozom oluşumunu engeller. Reaktif oksijen radikallerini nötralize eder, bakterinin fagozom içerisinde yaşamasına olanak sağlar (3, 4, 13).

***Salmonella* Patojenite Adası-3 (SPA-3):** SPA-3, toplam G+C içeriği %47,5 olan 17 kb'lık *Salmonella*-spesifik bir insersiyondur (14). *Salmonella* kromozomunun G+C içeriğinin %52 olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu adanın horizontal gen transferi sonucunda kazanıldığı anlaşılmaktadır. SPA-3'ün G+C içeriğinin analizleri, adanın mozaik bir yapıya sahip olduğu ve çok basamaklı bir işlemle sonra yavaş yavaş geliştiğini göstermektedir (3). SPA-3'ün virulens determinantları; MgtB ve MgtC'dir. Bu ada, makrofajlar içinde bakterinin hayatta kalması, üremesi, infeksiyonun sistemik fazı ve Mg transportu için gereklidir (15).

***Salmonella* Patojenite Adası-4 (SPA-4):** SPA-4, 27 kb büyüklüğünde bir ada olup, tRNA benzeri *ssb* genine bitişik vaziyette lokalize olmuştur. SPA-3 gibi SPA-4'te mozaik yapıya sahiptir (16). Genler arası bölgelerde G+C içeriği daha yüksekken, Open Reading Frame (ORF)'ler *Salmonella* kromozomu ile karşılaştırıldığında daha düşük G+C içeriğine sahiptir. SPA-4'te tahmini 18 ORF vardır. Yapılan sekans analizlerinden anlaşıldığı üzere, bu ada, *Escherichia coli* (*E. coli*) hemolizin sekresyonu ile çok benzer, toksin sekresyonuna aracılık eden Tip I Sekresyon Sistemini kodlar. Bakteriden izole edilen toksin immun hücrede apoptosisi indükler. SPA-4, sitotoksin sekresyonunda rol alır ve hücreyi apoptosise götürür. SPA-4'teki bir lokusun, makrofajlar içinde hayatta kalabilmek için gerekli olduğu bildirilmiştir (3, 17).

***Salmonella* Patojenite Adası-5 (SPA-5):** tRNA *serT*'nin içerisine sokulmuş 7,6 kb'lık küçük bir lokustur. Tüm G+C içeriği, %43,6 olup, mozaik bir yapıya sahiptir. SPA-5; SPA-1 ve SPA-2 tarafından kodlanan Tip III Sekresyon Sisteminin, her iki efektör proteini; *sopB* ve *sigD*'yi kodlar. SPA-5, asıl enteropatogenezi ile ilişkili olup, inflamasyon ve hastalığın enterik fazı ile alakalı klorid sekresyonu için gereklidir (3, 4).

**Salmonella Patojenite Adası-6 (SPA-6) veya Salmonella Kromozomal Adası (SKA):** *Salmonella* Typhi genom sekansında 59 kb'lık lokus, SPI-6 (18) ve ardından *Salmonella* Typhimurium için de *Salmonella* Kromozomal Adası (19) olarak adlandırılmıştır. SPA-6, *aspV* tRNA geni içerisine sokulmuştur ve fimbrialar için saf gen kümesini ve invasini kodlayan pagN'yi içerir. *Salmonella* Typhimurium'da, *Salmonella* kromozomal adasının delesyonu, sistemik patogenezis üzerinde herhangi bir etki yapmazken, hücre kültürlerinde invazyonda azalışa neden olmuştur (19). SPA-6 homologları, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Yersinia pestis* genom sekanslarında da tespit edilmiştir, fakat fonksiyonu bilinmemektedir (4).

**Salmonella Patojenite Adası-7 (SPA-7):** SPA-7, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Dublin, ve *Salmonella* Paratyphi C için spesifik bir lokustur. Bu lokus aynı zamanda *Salmonella* Typhi için Büyük Patojenite Adası (BPA; Major Pathogenicity Island; MPI) olarak adlandırılmaktadır (20). SPA-7, tRNA pheU'ya bitişik, 133 kb büyüklüğünde bir adadır (21). SPA-7 tarafından kodlanan en önemli virulens faktörü, bir kapsüler eksopolisakkarit olan Vi antijenidir (22). SPA-7 içinde, SPA-1'in kodladığı Tip III Sekresyon Sisteminin, *sopE* efektör proteinini kodlayan *sopE* fajı mevcuttur. Diğer taklitçi virulens faktörü (putative virulence factors), *pil* gen kümesi tarafından kodlanan tip IVB pilus'tur. SPA-7'nin genetik organizasyonu, oldukça komplekstir ve bu da, bu lokusun horizontal olarak kazanılan farklı elementlerden oluştuğunu işaret etmektedir. *Pil*, *tra*, ve *sam* genleri, SPA-7'nin konjugatif bir plasmid veya konjugatif bir transpozondan orijin aldığını işaret etmektedir. Pickard ve ark. (2003)'nin yaptığı çalışma, SPA-7'nin porsiyonlarının, bitki patojeni *Xanthomonas axonopodis pathovar citri* ve *P. aeruginosa* SG17M'yi de içine alan diğer birçok bakteride de bulunduğunu ortaya koymuştur (23). Ayrıca, *Salmonella* Typhi izolatlarında gözlemlenen Vi kapsül fenotipinin kaybı, SPA-7 lokusunun stabil olmadığını göstermektedir. Bitki patojeni, *Pseudomonas* ve *Salmonella enterica* arasındaki SPA-7 benzerliği, bu lokusun *Salmonella* ve diğer çevresel bakteriler arasındaki kontakla kazanıldığını göstermektedir (4, 23).

**Salmonella Patojenite Adası-8 (SPA-8):** SPA-8, *Salmonella* Typhi'nin genom sekansında, daha sonraları identifiye edilen bir adadır. Bu lokus, 6.8 kb

büyükliğinde ve *pheV* tRNA genine bitişiktir (18). Taklitçi virulens faktörleri, bakteriyosin genleridir fakat henüz bununla ilgili fonksiyonel bir veri mevcut değildir. İntegrarı kodlayan genin varlığı, SPA-8'in mobilitesine işaret etmektedir. Hensel ve ark. (2004) (4), SPI-8'in *Salmonella* Typhi için spesifik olduğunu bildirirken, Saroj ve ark. (2008) (24)'nin yaptıkları çalışmada; *Salmonella* Washington, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Paratyphi A ve *Salmonella* Typhimurium'da SPA-8'i tespit edildiği ortaya konmuştur. Diğer serovarlar arasında yayılımı henüz açıklığa kavuşmamıştır (4).

**Salmonella Patojenite Adası-9 (SPA-9):** 16,281 bp'lık bu lokus, *Salmonella* Typhi kromozomunda lizojenik bir bakteriyofaja bitişik olarak lokalize olmuştur (18). SPI-9 tarafından kodlanan taklitçi virulens faktörleri; Tip I Sekresyon Sistemi ve RTX-benzeri proteindir. Bu lokus aynı zamanda *Salmonella* Typhimurium kromozomunda da mevcuttur, fakat RTX-benzeri toksinin ORF'si bir pseudogen olarak gözükmemektedir. SPA-9'un bölümleri ve bitişik bakteriyofaj genomunun diğer serovarlar ve *Salmonella bongori* tamamlanmamış genom sekansında bulunması, bu adanın korunmuş dağılımını göstermektedir (4).

**Salmonella Patojenite Adası-10 (SPA-10):** SPA-10, tRNA *leuX*'ta lokalize olan 32.8 kb'lık bir insersiyondur. Ada içerisinde, aynı zamanda kriptik bir bakteriyofaj mevcuttur (18). SPA-10 tarafından kodlanan bilinen virulens faktörleri sef fimbrialdır. Sef fimbrialarının yayılımının, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Enteritidis serovarları ile sınırlı olması, konak spesifitesini belirleyen bir faktör olarak kabul görmüştür (25). Ayrıca Saroj ve ark. (2008) (24), inceledikleri 42 *Salmonella* Typhimurium izolatının 3'ünde SPA-10'u tespit etmişlerdir. SPA-10'un dağılımında bakteriyofajın rolü ise henüz açıklığa kavuşmamıştır (4).

## Sonuç

SPA'ların patogeneze katkısı oldukça farklı olmasına rağmen, SPA'lar arasında pek çok ortak motif mevcuttur. Sonuç olarak, çok sayıda patojenite adasının kazanımı, mikroorganizmanın infeksiyon oluşturmada oldukça başarılı patojen özelliğe ulaşmasıyla, *Salmonella enterica* evriminde oyun kurucu (pivot) vazifesi görmektedir. *Salmonella* patojenite adalarının fonksiyonlarının açıklığa kavuşması

ve diğer mobil elementlerle etkileşimi, *Salmonella enterica*'nın virulensinin moleküler mekanizmasını gün ve gün daha fazla anlamamıza yol açacaktır.

## Kaynaklar

- Schmidt H, Hensel M, (2004). *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis*. Clin Microbiol Rev. 17, 14-56.
- Groisman EA, Ochman H, (1996). *Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps*. Cell. 87, 791-794.
- Sandra LM, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB, (2000). *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. Microb and Infec. 2, 145-156.
- Hensel M, (2004). *Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica*. Int J Med Biol. 291, 95-102.
- Collazo CM, Galan JE, (1997). *The invasion-associated type-III protein secretion system in Salmonella*. Gene. 192, 51-59.
- Groisman EA, Ochman H, (1997). *How Salmonella became a pathogen*. Trends in Microbiol. 5, 343-349.
- Suarez M, Rüssmann, (1998). *Molecular mechanisms of Salmonella invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island I*. Microbiol. 1, 197-204.
- Jones BD, Falkow S, (1994). *Identification and characterization of a Salmonella typhimurium oxygen-regulated gene required for bacterial internalization*. Infect Immun. 62, 3745-3752.
- Fu Y, Galan JE, (1998). *The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptPis translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton*. Mol Microbiol. 27, 359-368.
- Hensel M, Shea JE, Baumler AJ, Gleeson C, Blattner FR, Holden DW, (1997). *Analysis of boundaries of Salmonella pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol. 179, 1105-1111.
- Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C, (1999a). *Molecular and functional analysis indicates mosaic structure of Salmonella pathogenicity Island 2*. Mol Microbiol. 31, 489-498.
- Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC, (1999b). *The genetic basis of Salmonella Typhimurium*. Mol Microbiol. 32, 275-288.
- Hensel M, Shea JE, Waterman SR, Mundy R, Nikolaus T, Banks G, Vazquez-Torres A, Gleeson C, Fang FC, Holden DW, (1998). *Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages*. Mol Microbiol. 30, 163-174.
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA, (1999). *The SPI-3 pathogenicity islands of Salmonella enterica*. J Bacteriol. 181, 998-1004.
- Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF, (2003). *Variation between pathogenic serovars within Salmonella pathogenicity islands*. J Bacteriol. 185, 3624-3635.
- Wong KK, McClelland M, Stillwell LC, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD, (1998). *Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a Salmonella pathogenicity island located at 92 min on the chromosome map of Salmonella enterica serovar typhimurium LT2*. Infect Immun. 66, 3365-3371.
- Chen LM, Kaniga K, Galan JE, (1996). *Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages*. Proc Natl Acad Sci. USA. 93, 4197-4201.
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Bentley SD, Holden MT, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connor P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen TS, Leather S, Moule S, O'Gara P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, White head S, Barrell BG, (2001). *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18*. Nature. 413,848-852
- Folkesson A, Lofdahl S, Normark S, (2002). *The Salmonella enterica subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells*. Res Microbiol. 153, 537-545.
- Zhang XL, Morris C, Hackett J, (1997). *Molecular cloning, nucleotide sequences, and function of a site-specific recombinase encoded in the major 'pathogenicity island' of Salmonella Typhi*. Gene. 202, 139-146.
- Hansen-Wester I, Hensel M, (2002). *Genome based identification of chromosomal regions specific for Salmonella spp*. Infect Immun. 70, 2351-2360.
- Seth-Smith HMB, (2008). *SPI-7: Salmonella's Vi-encoding pathogenicity island*. J. Infect. Developing Countries. 2, 267-271.
- Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, Barron A, Gaora PO, Chabalgoity JA, Thanky N, Scholes C, Thomson N, Quail M, Parkhill J, Dougan G, (2003). *Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding Salmonella enterica pathogenicity island SPI-7*. J Bacteriol. 185, 5055-5065.
- Saroj SD, Shashidhar R, Karani M, Bandekar JR, (2008). *Distribution of Salmonella pathogenicity island SPI-8 and SPI-10 among different serotypes of Salmonella*. J Med Microbiol, 57, 424-427.
- Townsend SM, Kramer NE, Edwards R, Baker S, Hamlin N, Simmonds M, Stevens K, Maloy S, Parkhill J, Dougan G, Baumbler AJ, (2001). *Salmonella enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences*. Infect Immun. 69, 2894-2901.