

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

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

Cilt/Volume 23 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2012

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi

Cilt/Volume 23 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2012

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 / ehh.o@etlikvet.gov.tr

Danışma Kurulu / Advisory Board *

Doç. Dr. Tülay Akaylı	İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ali Arslan	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Gülşen Goncagül	Uludağ Üniversitesi Mennan Pasinli Meslek Yüksekokulu
Doç. Dr. Mehmet Taner Karaoğlu	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ragıp Kılıçarslan	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Jale Korun	Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı
Doç. Dr. Filiz Kök	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD
Doç. Dr. Oğuz Kul	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Tuba Çiğdem Oğuzoğlu	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Barış Sarı	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Hasan Solmaz	Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Nihat Toplu	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Tuzcu	Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji 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 2012, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2012, 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

Türkiye’de ihraç edilen *Bivalvia* türlerinden *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu

Isolation and identification of *Vibrio* spp. from *Bivalvia* spp. which are exported by Turkey

Yavuz Demir 1

Aynalı sazan balığı (*Cyprinus carpio carpio* L., 1758) kıymasından hazırlanan köftelerin raf ömrü üzerine timol’ün etkisi

The effect of thyme on the storage time of fish balls prepared from mirror carp (*Cyprinus carpio carpio* L.,1758)

Özlem Pelin Can, Özlem Emir Çoban 9

Köpek ve kedilerde kuduz antikör titre tayininin retrospektif değerlendirilmesi

Retrospective evaluation of the rabies antibody titre determination in dogs and cats

Nil Ünal, Orhan Aylan, Hikmet Ün, Conrad Freuling, Thomas Müller..... 15

Almanya’da fertilité problemlili ineklerde endometriyal svabların bakteriyolojik bulguları ve antibiyotik dirençliliği

Bacteriological findings and antibiotic resistance in endometrial swabs of cows with fertility problems in Germany

Gülşen Goncagül, Kamil Seyrek İntaş, Reinhard Weiss, Ellen Prenger-Berninghoff, Rainer Hospes, Axel Wehrend 23

Olgu Sunumu / Case Report

Bir kuzuda giardiosis olgusu

A giardiosis case in a lamb

Akın Kırbaş, İbrahim Balkaya, Ahmet Temur 29

Derleme / Review

***Salmonella* klasik virulans faktörleri ve patojenite adaları (11, 12, 13, 14, 15, 16, SGA-1, YPA)**

Salmonella classical virulence factors and pathogenicity islands (11, 12, 13, 14, 15, 16, SGI-1, HPA)

Elçin Günaydın, Selahattin Şen 32

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 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, 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 Republic of Turkey 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

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, 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 trademarks 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.

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

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

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

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

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

Yazar ad/ları İmza Tarih

Yazışma Adresi:

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

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

Title of paper:

Authors names:

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

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

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

To be signed by all author/s

Authors names Signature Date

Correspondence Address:

Türkiye’de ihraç edilen *Bivalvia* türlerinden *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu*

Yavuz DEMİR

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Gıda Kontrol Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 23.11.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 14.05.2012

Özet: Bu çalışmada, Ege ve Marmara denizi kıyılarında kültürü yapılan *Bivalvia* türlerinden kontaminasyon sonucu insanlarda enfeksiyona sebebiyet veren *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Marmara ve Ege bölgesinde bulunan üretim istasyonlarından alınan 6 farklı türdeki 958 *Bivalvia* bakteriyolojik yönden incelendi. Örneklerden fenotipik testlerle izole edilen 35 *Vibrio* türünün çoğunluğu *V.parahaemolyticus* ve *V.alginolyticus* olarak tanımlandı. Marmara ve Ege sahil şeridinde bu bakterilerin yoğun olduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: *Bivalve* spp., identifikasyon, *Vibrio* spp.

Isolation and identification of *Vibrio* spp. from *Bivalvia* spp. which are exported by Turkey

Summary: In this research, *Vibrio* spp., causing infections in humans as a result of contamination, were isolated and identified from the costs of Aegean and Marmara Seas in which *Bivalvia* species have been cultured. The material of this research was a total of 958 *Bivalvia* spp., chosen from 6 *Bivalvia* species which have been produced in regions of Aegean and Marmara Seas were investigated by bacteriologically. Totally 35 *Vibrio* spp. were identified by phenotypic tests, with a majority, *V.parahaemolyticus* and *V.alginolyticus* were isolated from samples. These microorganisms, detected in this project, were densely determined in the costs of Aegean and Marmara Seas lines.

Keywords: *Bivalve* spp., identification, *Vibrio* spp.

Giriş

Bivalvia türleri, deniz suyundaki partikülleri süzerek beslenirler. Gıdaları, deniz suyunda yaşayan mikroorganizmaların karışımı ve inorganik partiküllerden oluşmaktadır. *V.parahaemolyticus* gibi bazı heterotropik mikroorganizmaların, *Bivalvia* türlerinin sindirim sürecine girerek dokularına yerleştiği bildirilmektedir (8). Çoğu *V.parahaemolyticus* serotipleri insanlar için patojen olduğundan, su ürünleri ve insan gıda tüketimi sağlığında daimi bir tehlike oluşturmaktadır. *Bivalvia*’lar genellikle dünya çapında yüksek sağlık riski taşıyan gıda grubu olarak kabul edilmektedir (8).

Wright ve ark., (32) ve Charles ve ark., (9) yaptıkları çalışmalara göre, midyelerin 1-2 µm boyutundaki partikülleri tutma özelliklerine sahip olduğu bildirilmektedir. Fakat *Bivalvia*’ların sudan direkt bakteri tutma kapasiteleri hala tartışılmaktadır. *Bivalvia*’ların bakterileri direk kendileri mi yoksa trofik linkleri ile mi süzdükleri hala tartışma konusudur (9, 12, 21, 25). Her ne şekilde olursa olsun,

deniz ortamında yaygın olarak bulunan *Vibrio* spp. türü bakterilerin *Bivalvia*’larda bulunabildikleri bildirilmiştir (6).

Cook (11)’un *Bivalvia*’lar üzerine yaptığı çalışmalarda, bu canlıların deniz suyunu filtre ederek beslenen canlılar olduğu için, solungaç siliolarından deniz suyunu transfer ederek partikülleri solungaç filamentlerine gönderdiklerini ve mukus salgılayan filamentleri ile birçok organizmayı ve inorganik partikülü yakaladıklarını belirtmiştir. Partiküller mideye ulaştığı zaman kristalin tarzı enzimleriyle sindirimlerinin başladığı ifade edilmektedir. Paster ve ark., (26) yaptıkları araştırmalarda bazı mikroorganizmaların digestiv aşamaya direndikleri belirtilmiştir. Capello ve ark., (8) *V.parahaemolyticus* gibi bazı heterotropik mikroorganizmaların *Bivalvia* sindirim sürecine girerek dokularına yerleştiğini söylemektedir. Çoğu *V.parahaemolyticus* serotipleri insanlar için patojen olduğundan, su ürünleri ve insan gıda tüketim sağlığında daimi bir tehlike oluşturmaktadır. *Bivalvia*’lar genellikle dünya çapında yüksek sağlık riski taşıyan gıda grubu olarak

kabul edilmektedir. *V.parahaemolyticus*' un, Şili'de pişmemiş kabuklu tüketimi ile ilgili çıkan gastroenteritis salgınlarının etiyolojik ajanı olduğu raporlanmıştır (11).

Wright ve ark., (33), Daniels ve ark., (12), Volety ve ark., (29) *Bivalvia*'ların çok sayıdaki sulu ortam bakteri türleri için habitat teşkil ettiğini ifade etmektedirler. Bunların bazıları, insan gıdası olarak tüketimi sonucu şiddetli gastroenteritis vakalarına sebep olmaktadır (8). *Bivalvia*'ların bakteriyel ekolojisini daha iyi anlamak, çiftliklerin daha yüksek üretimini sağlamak ve insan gıdası tüketimi olarak kullanımlarında güvenliklerini arttırmak açısından önemlidir. Bu vertabrasızların mikrofloraları hakkında çok fazla veri bulunmamaktadır. *Bivalvia*'lar ile yapılan çalışmalarda, Colwell ve Listin (10), Kueh ve Tamplin (20), Prieur (27), Olafsen ve ark., (25) *Vibrio* spp.lerin koloni sayımlarının 30'a varan oranlarda izole edildiklerini açıklamışlardır. Walne (31), Tubiash ve ark., (28), Dungan ve Elston (14), Nicolas ve ark., (23) *Bivalvia* üretim çiftliklerinde üretimi yapılan *Bivalvia*'larda görülen bir çok hastalık problemlerini gram negatif mikroorganizmalara atfetmektedir.

Vibrio türleri doğal ortamda ve deniz suyunda bol miktarda bulunurlar ve bu yüzden etiyolojik ajan olarak *Vibrio* türlerinin eradikasyonunun imkânsız olduğu bildirilmektedir (2). *Vibrio* enfeksiyonları pestisit, ağır metal, toksik fitoplankton, petrol ürünü toksikantlarının etkilediği su kalitesine ve kötü üretim koşulları ile doğrudan bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir. Austin ve ark., (3) *Vibrio* türlerinin, üretimi yapılan *Bivalvia* alanlarındaki üretim metabolitlerinin ya da alg kültürlerinden kaynaklanan çözünmüş organik substratların üretim sisteminde artmasıyla oluşan uygun ortam sonucu tespit edilebileceğini belirtmişlerdir.

Bu cinsin üyeleri, doğal ortamda mevcut olan deniz ve denize açılan akarsu ağızlarında, havuz ve göl sularında, gastrointestinal kanalda, fekal kontamine atıklarda ve kontamine gıdalarda tüm dünyada bulunurlar (1, 6, 15, 17, 19, 22). *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* ve *V.mimicus* özellikle su ve gıda kaynaklı hastalık oluşturabilen önemli insan patojenleridir (30). *Vibrio* genusu, düz yada kıvrık çomak formu ile, 0.5-0.8 mikrometre genişlikte ve 1.4-2.6 mikrometre uzunlukta gram negatif, bir ya da daha fazla polar flagellası ile hareketli, fakültatif anaerobik, fermentatif ya da

oksidatif metabolizmayla şekerleri parçalayabilen, sitokrom oksidaz pozitif, 0/129 vibriostat ajanına duyarlı, deniz ve denize açılan suların habitatını oluşturduğu mikroorganizmalardır (7). *Vibrio* türlerinin çoğu insanlar için patojeniktir. Bu türe ait bazı üyelerin, ılık kıyı sularına sahip *Bivalvia* ve diğer deniz ürünlerinin tüketildiği ülkelerde insanların sindirim sistemi enfeksiyonu etkeni olduğu belirtilmiştir (1, 6, 7, 15, 17, 18, 19, 22).

Bu çalışmada, ülkemizin Ege ve Marmara sahillerinde üretimi yapılan *Bivalvia* türlerinden *Ostrea edulis* (İstiridye), *Tapes decussatus* (Akivades), *Mytilus galloprovincialis* (Kara midye), *Modiolus barbatus* (Kıllı midye), *Venus verrucosa* (Kidonya), *Donax trunculus* (Kum şırlanı) türleri kullanılarak, halk sağlığında ve ihracatta ciddi risk oluşturan *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* ve risk oluşturabilecek diğer *Vibrio* türlerinin tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada, *Vibrio* spp. izolasyonu amacıyla kullanılan toplam 958 adet *Bivalvia* numunesinden 304'ü Balıkesir ili Ayvalık yetiştirme bölgelerinden, 113'ü İzmir ili Merkez ve Çeşme bölgesi üretim bölgelerinden, 541'i Çanakkale ili merkez üretim bölgelerinden temin edildi. Örnekler türlerin aylara göre hasat zamanında Ocak ayından Temmuz ayına kadar düzenli sayıda alındı. Alınan örnekler soğuk zincir kuralına uyularak 24 saat içinde Food and Drug Administration (FDA) (15) metoduna göre, *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* ve diğer *Vibrio* türlerinin izolasyonuna başlandı. Çalışmada 958 örnekten, 97 Kidonya (*V.verrucosa*), 570 Kum şırlanı (*D.trunculus*), 116 Akivades (*T.decussatus*), 67 Kara midye (*M.galloprovincialis*), 53 Kıllı midye (*M.barbatus*), 55 İstiridye (*O.edulis*) kullanıldı.

Standart *Vibrio cholerae* suşu: *V.cholerae* ogawa non O1 suşu, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı SHAM/Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı Birimi'nden liyofilize olarak temin edildi. Pandemi salgınlara neden olan kolera vakasının etiyolojik ajanı olan *V.cholerae* O1 ve O139 suşları ise, ülkemizde pandemik koleranın uzun yıllardır görülmemiş ve eradike edilmiş olmasından dolayı güvenlik gerekçesi nedeniyle suş talebi kabul edilmediği için çalışmada kullanılmadı.

Tablo 1. Üretim tesislerinden alınan *Bivalvia* türlerinin aylara göre dağılımı ve sayıları

Aylar	Analize Alınan Tür Sayısı					
	İstiridye (<i>O.edulis</i>)	Kum şırlanı (<i>D.trunculus</i>)	Akivades (<i>T.decussatus</i>)	Kara Midye (<i>M.galloprovincialis</i>)	Kıllı Midye (<i>M.barbatus</i>)	Kidonya (<i>V.verrucosa</i>)
Ocak	3	30	10	4	-	3
Şubat	6	90	35	4	8	6
Mart	6	90	45	4	-	6
Nisan	12	150	55	-	4	12
Mayıs	6	-	25	-	-	3
Haziran	3	60	35	16	12	3
Temmuz	-	150	35	16	8	3
Toplam	36	570	240	44	32	36
Genel Toplam						958

Standart *Vibrio parahaemolyticus* suşu: *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubu (Kod: M1623B), İngiltere Weymouth Cefas Community Reference Laboratory <http://www.crlcef.org> (Ulusal Referans Laboratuvarı)'dan canlı olarak temin edildi.

Deney hayvanları: Standart *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* suşlarından antiserum hazırlamak amacıyla, 17.11.2009 tarih ve 8447 sayılı Etik Kurulu Kararı ile her bir suş için 1'er adet olmak üzere 1.5-2 kg ağırlığındaki Yeni Zelanda tavşanlarından (*Oryctolagus cuniculus*) 3 adet kullanıldı.

İzolasyon prosedürü: Çalışmada kullanılacak örnekler, 2009 yılı ocak ile temmuz ayları arasında, soğuk zincir kuralına uygun şekilde alınarak laboratuvara getirildi (Tablo 1). Diğer gün analize alınacak örnekler +4°C'de muhafaza altına alındı. Örnekler steril eldiven, bıçak, havan ve steril pens, makas yardımı ile açılarak, örneklerden 25 gr tartıldı. Örnekler steril kum vasıtası ile ezilerek homojen hale getirildi. Yeterince homojenize edilemeyen durumlarda, homojenizatörden yararlandı.

Tartılan ve homojenize edilen örnekler, 225 ml. Alkali Peptonlu Su (APS)'ye 1/10 oranında inoküle edildi (25 gr) ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı (donmuş örnek kullanılırsa 2 kat kuvvetinde APS'ye inoküle edildi).

İnkübasyon sonunda APS' den bir öze dolusu alınarak Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose agara (TCBS) tek koloni düşürme metodu ile ekim yapıldı. Besiyeri 37°C'de bir gece inkübe edildi.

Üreyen *Vibrio* spp. şüpheli sarı veya yeşil kolonilerden öze ile alınarak %1,5 NaCl Tryptic Soy buyyona geçildi, 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonu Tryptic Soy buyyonundan tekrar TCBS agara geçilerek saf koloni elde edildi. Üreyen saf kolonilerden Tryptic Soy agara (TSA) alt kültürü yapılarak, identifikasyon için biyokimyasal test çalışmalarına geçildi (15).

Temel özellikler ve biyokimyasal testler: TSA'da üreyen saf koloniden; hareket muayenesi, Gram boyama, sitokrom oksidaz testi, katalaz testi, O/F, jelatin hidroliz testi, O/129 vibriostat ajana duyarlılık testleri yapıldı. Belirtilen özelliklere bakılan saf koloniden, biyokimyasal testlerle identifikasyona devam edildi. Bütün biyokimyasal testler tamamlanarak tür tespiti, Arda M. (1997), Austin B. (2002), Bekar M. (2003), FDA (2004), ISO/TS (2007)' de belirtilen araştırmacılara göre yapıldı (1, 4, 6, 15, 18).

Vitec II cihazı ile identifikasyon: Tüm testlerin uygulanmasından sonra, TSA'da üreyen saf kültürden Gram boyama yapılarak, Vitec II Compact cihazının (Biomerioux) gram negatif bakteri identifikasyonunda kullanılan identifikasyon kartları ile cihaza verildi, yaklaşık 12-24 saat cihazdaki inkübasyon periyodundan sonra sonuçlar okundu.

Standart suşlardan hiperimmün antiserum hazırlanması: Antiserum üretiminde kullanılan standart suşların, bildirilen bakteri olup olmadıklarının tespiti ve doğrulama için API 20E identifikasyon sistemi ID 32 (Bio Merieux) kullanıldı. TSA'da üre-

yen saf kültürden daha önceden fizyolojik tuzlu su (FTS) ile hazırlanan %0,3'lük formalin içine alındı. Bu süspansiyon önce 56°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Su banyosundan sonra +4°C'de 15 dakika 3000 rpm' de santrifüje edildi. Santrifüj sonunda tüpteki süpernatant alınarak FTS ile McFarland tüp: 4 değeri ile $1,2 \times 10^8$ cfu/ml hücreye eşdeğer olacak şekilde ayarlandı. Her iki standart kültür için ayrı ayrı hazırlanan bu süspansiyondan tavşanlara 4'er gün ara ile kulak venasından İV yolla sırası ile 0,2- 0,5- 1,0- 1,5 ve son olarak da 2 ml miktarında enjekte edildi. Son aşama olarak 1 hafta sonra formalin kullanılmadan aynı şekilde hazırlanan canlı kültür süspansiyonundan 0,5 ml SC yolla enjekte edildi. Enjeksiyon periyodu bitiminden 10 gün sonra tüm tavşanların kanları alınarak, kan serumları -20°C'de saklandı (16, 24).

Hiperimmün serumların titrasyonlarının belirlenmesi: Steril 10 adet tüpün birincisine 0,8 ml FTS, 0,2 ml titrasyonu belirlenecek serum konuldu. Diğer 9 tüpe 0,5 ml FTS konuldu. 1. tüpte serumun ¼ sulandırması yapıldıktan sonra 2 katlı sulandırma yapılarak, 1. tüpten sırası ile 0,5 ml steril pipet yardımı ile 2.- 3.- 4. ve en son tüpe kadar aktarıldı. Son tüpten 0,5 ml dışarı atıldı. Böylece tüplerdeki dilüsyon değerleri sırası ile 1. tüpte 1/8, 2. tüpte 1/16, 3. tüpte 1/32 ve sırası ile 1/64, 1/128, 1/256 ve en son

tüpte 1/2048 oldu (24). Eldeki hiperimmün serum ile McFarland:4 değeri ile $1,2 \times 10^8$ cfu/ml hücreye eşdeğer olacak şekilde standardizasyonu yapılan aynı türdeki antijen solüsyonundan 0,5 ml sırası ile 1. tüpten son tüpe kadar ayrı pipet ucu kullanılarak eklendi. 1. tüpten 6. tüpe kadar aglutinasyon reaksiyonları gözlemlendi, 7. tüpte bu reaksiyon gözlemlenmedi. Böylece hiperimmün antiserumun titrasyonu; aglutinasyon gözlenen en son tüpten bir sonraki tüp olan 7. tüpte 1/512 olarak tespit edildi.

Aglütinasyon tekniği ile saha suşlarının serotiplendirilmesi: Lam üzerine 1 damla FTS damlatıldı. Üzerine serotiplendirilmesi amaçlanan tek bir koloni alındı ve bir damla titrasyonu belirlenmiş antiserum ilave edilerek iğne uçlu öze ile karıştırıldı. 30 sn. sonunda verdiği aglutinasyon sonucu lam üzerinde oluşan presipitasyona göre değerlendirildi (24).

Bulgular

Mikrobiyolojik muayene: Ayvalık bölgesinden alınan 113 örneğin 20 (%17.6)' sinden, Çanakkale bölgesi yetiştirme istasyonlarından alınan 541 örneğin 14 (%2.5)' ünden, İzmir merkez ve Çeşme ilçesi üretim yerlerinden alınan 113 örneğin 1 (%0.8)' inden *Vibrio* spp. izole edildi.

Tablo 2. Araştırmada kullanılan *Bivalvia* spp. örneklerinden izole edilen *Vibrio* türlerinin aylara ve *Bivalvia* türlerine göre dağılımı

Aylar	Analiz Edilen Türler					
	İstiridyeye (<i>O.edulis</i>)	Kum şırlanı (<i>D.trunculus</i>)	Akivades (<i>T.decussatus</i>)	Kara Midye (<i>M.galloprovincialis</i>)	Kıllı Midye (<i>M.barbatus</i>)	Kidonya (<i>V.verrucosa</i>)
Ocak	-	-	<i>V.alginolyticus</i>	-	-	<i>V.alginolyticus</i>
Şubat	-	-	-	-	-	-
Mart	<i>V.furnissii</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.mimicus</i> <i>V.paraahaemolyticus</i>	-	-	<i>V.hollisae</i> <i>V.furnissii</i>
Nisan	-	<i>V.metschnikovii</i>	<i>V.alginolyticus</i>	-	-	-
Mayıs	<i>V.paraahaemolyticus</i>		<i>V.alginolyticus</i> <i>V.paraahaemolyticus</i>			<i>V.paraahaemolyticus</i>
Haziran	-	<i>V.paraahaemolyticus</i>	<i>V.paraahaemolyticus</i>	<i>V.paraahaemolyticus</i> <i>V.alginolyticus</i>	<i>V.paraahaemolyticus</i>	<i>V.alginolyticus</i>
Temmuz	-	<i>V.paraahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i> <i>V.alginolyticus</i>	<i>V.paraahaemolyticus</i>	-	<i>V.alginolyticus</i>

Otomatize sistemle *Vibrio* spp. identifikasyonu: Klasik yöntemler ile izole ve identifiye edilen 18 *V.paraahaemolyticus*, 11 *V.alginolyticus* ve 1

V.vulnificus, otomatize identifikasyon sistemiyle de aynı sonucu verdi. Ancak klasik yöntemlerle tespit

edilen 3 *V.furnissii*, 1 *V.mimicus*, 1 *V.metschnikovii* otomatize sistemle tespit edilemedi.

İzole edilen *Vibrio parahaemolyticus* suşlarının serolojik muayenesi: Standart *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* suşlarından belirtilen metotla hiperimmun serumları elde edildi. Elde edilen hiperimmun serumların titrasyonlarının tespitinde kullanılan metot ile yapılan analiz sonucunda 1. tüpten 6. tüpe kadar aglutinasyon reaksiyonları gözlemlendi, 7. tüpte bu reaksiyon gözlenmedi. Böylece hiperimmun antiserumun titrasyonu; aglutinasyon gözlenen en son tüpten bir sonraki tüp olan 7. tüpte 1/512 olarak tespit edildi.

Yapılan serolojik muayene sonucu, katı agarda saf olarak üretilen standart *V.cholerae* ogawa non-O1 ve standart *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 kolonisi ile yapılan test kontrolü sonunda, lam üzerinde aglutinasyon sonucu oluşan presipitasyon görüldüğü halde, izole edilen hiçbir saha şusu *V.cholerae* ogawa non-O1' den hazırlanan hiperimmun serumla aglutinasyon vermedi. *V.parahaemolyticus* O:3 K:6'dan hazırlanan hiperimmun serumla yapılan incelemede 18 *V.parahaemolyticus*'un hiçbirinde aglutinasyon saptanmadı.

İdentifiye edilen saha suşları: Bu çalışmada yapılan identifikasyon sonucu, ocak ve Temmuz ayları arasında düzenli olarak alınan örneklerden, *V.alginolyticus*, *V.furnissii*, *V.mimicus*, *V.parahaemolyticus*, *V.hollisae*, *V.metschnikovii*, *V.vulnificus* türleri izole ve identifiye edilmiştir (Tablo 2).

Sahadan identifiye edilen *Vibrio* türleri ve sayıları:

Tablo 3. Araştırmada kullanılan *Bivalvia* örneklerinden izole edilen *Vibrio* izolatlarının dağılımı ve sayısı

İzole edilen türler	Sayı
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
<i>Vibrio alginolyticus</i>	11
<i>Vibrio vulnificus</i>	1
<i>Vibrio furnissii</i>	3
<i>Vibrio mimicus</i>	1
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1
<i>Vibrio spp. (identifikasyon yapılamadı)</i>	1
Toplam	36

Tablo 4. Sahadan izole edilen *Vibrio* türlerinin identifikasyon özellikleri

Fenotipik Özellikler	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.mimicus</i>	<i>V.metschnikovii</i>	<i>Vibrio spp. (identifikasyon yapılamadı)</i>
TCBS Agarda Koloni Rengi	S	Y	Y	S	Y	S	S
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+	-	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+
TSA' da yayılma	+	+	+	-	-	+	-
Jelatin Hidroliz	+	+	+	+	+	+	-
22°C de üreme	-	+	+	+	+	+	+
37°C de üreme	+	+	+	+	+	+	+
42°C de üreme	+	+	+	-	+	+	+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	+	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Oksidasyon/Fermentasyon	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ONPG	-	-	-	-	+	+	-
Ürease	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	-	-	+	+	+	+
Hemoliz (KA) da	+	+	+	-	+	-	-/-
H ₂ S/Gaz	-	-	-	+	-	-	-
MR/VP	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-
%0 NaCl üreme	-	-	-	-	+	-	+
%3 NaCl üreme	+	+	+	+	+	+	+
%8 NaCl üreme	+	+	+	+	-	ÜA	+
%10 NaCl üreme	+	-	-	-	-	-	-
LDC	+	-	+	-	+	+	-
ADH	-	+	-	+	-	+	-
ODC	+	+	+	-	+	-	-
10µg O/129	D	D	d	D	d	d	D
150 µg O/129	d	d	d	d	d	d	d

S= Sarı, Y= Yeşil, ÜA=Üreme yok/ az, D= Dirençli, d= Duyarlı

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada kullanılan örnekler kış, ilkbahar ve yaz başlangıcında alınarak analizleri tamamlanmıştır. Sonbahar ayları, *Bivalvia* üretim istasyonlarındaki üretimi yapılan türlerin çoğunun ihracata kapalı olmasından dolayı bu çalışmaya dahil edilememiştir. Analize alınan bölgelerden Çanakkale ili, Balıkesir ili Ayvalık ilçesi, İzmir ili Merkez ve Çeşme ilçesinden toplanan örneklerin aylara göre dağılımı ve sayıları tablo 1’de verildi. Toplam 958 *Bivalve* spp. örneğinden *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V.vulnificus*, *V.furnissii*, *V.mimicus* ve *V.metschnikovii* identifiye edildi. 1 *Vibrio* suşu da yapılan biyokimyasal testlerle tanımlanamadı. İdentifiye edilen *Vibrio* türlerinin fenotipik özellikleri tablo 4’ de verildi.

Biyokimyasal testlerle identifiye edilen 18 *V.parahaemolyticus* suşunun standart *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubuna ait olup olmadığının tespiti amacı ile, Yeni Zelanda tavşanı (*O.cuniculus*) kullanılarak bu serogrup için elde edilen hiperimmün serumun titrasyonları belirlenerek serotiplendirmede lam aglutinasyon tekniği kullanıldı. Ancak incelenen 18 *V.parahaemolyticus* suşunun hiçbirisinde lam aglutinasyon sonu presipitasyon gözlenmedi ve sahadan elde edilen *V.parahaemolyticus* suşlarının *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubuna ait olmadığı tespit edildi. Bu durum, Marmara ve Ege sahillerimizde üretimi yapılan *Bivalvia*’ların, gastroenteritislerin önemli etkenlerinden birisi sayılan bu serogrubla kontamine olmadığı anlaşıldı. Tablo 2 ve 3’ de izole edilen *Vibrio* türlerinin aylara göre dağılımları ve sayıları verildi.

Mevcut çalışmada *V.alginolyticus* suşları identifiye edilerek, suşlar arasında İndol testi, ornithin dekarboksilaz (ODC) testi ve 22°C üreme testlerinde farklılık gösterdikleri anlaşıldı. Austin (2), *V.alginolyticus* için indol testi değerini pozitif olarak verdiği halde Bekar (6) çalışmalarında bu değeri negatif olarak belirtmiştir. Aynı şekilde bu tür için ODC ve 22°C’ de üreme testlerinin sırasıyla bu çalışmada pozitif ve negatif oldukları görüldü. FDA (15), *V.alginolyticus* için ODC değerini pozitif olarak belirtmiştir. Austin (2) *Vibrio* türleri için bu değeri belirtmemiştir. Bekar (6) bu tür için ODC testinin çalışmalarında pozitif olduğunu belirtmiştir. 22°C üreme testi, bu tür için Austin (2) ve FDA

(15)’ da belirtilmediği halde Bekar (6) çalışmalarında negatif olarak belirtmiştir.

V.vulnificus bu çalışmada, belirtilen identifikasyon tablolarında verilen değerlerden 2 biyokimyasal değeri ile farklılık gösterdi. Bunlardan ONPG testi ve %8 NaCl sıvı buyyonda üreme testinde Austin (2) ve FDA (15)’ nin bu tür için çalışmalarında bu değerler verilmemiştir, Bekar (6) yaptığı çalışmalarda bu değerleri sırası ile pozitif ve negatif verdiği halde, bu çalışmada sırası ile negatif ve pozitif olarak tespit edildi. Çalışmada tespit edilen *V.furnissii*, identifikasyon tabloları ile sadece ONPG testinde farklılık gösterdi. FDA (15) ve Bekar (6)’ da verilen tanımlama tablolarında bu test *V.furnissii* için pozitif olduğu halde, yapılan çalışmada negatif olduğu görüldü. Yapılan identifikasyonda biyokimyasal testler sonucu 1 *V.metschnikovii* izole edildi, fakat bu *Vibrio* türü bakteri, verilen tanımlama tablolarından, Voges-Proskauer (VP) testi, 42°C’de ve ODC testi ile farklılık gösterdi. Yapılan bu çalışmada, *V.metschnikovii* için bu değerler sırası ile negatif, pozitif ve negatif olduğu tespit edildi. FDA (15)’da bu değerler sırası ile pozitif, değişken ve negatif verilmiştir. Bekar (6) yaptığı çalışmalarda, bu tür için sırası ile bu değerleri pozitif, değişken ve pozitif olarak belirtmiştir. Farklılık gösteren testler, *Vibrio* türlerinin temel özellikleri dışındaki biyokimyasal değerlerinin %100 oranında aynı olmadığını ve tanımlama tablolarında verilen biyokimyasal değerlerin bazılarının %10-20 oranında farklı değer verebileceğini gösterdi.

Dileep ve ark., (13), *Bivalve* spp. örnekleriyle yaptıkları çalışmada, 86 örnekten konvansiyonel analizler ve *V.parahaemolyticus*’un toxR geninin tespitini amaçlayan moleküler çalışmalar yapmışlardır. Konvansiyonel yöntemle 28 adet, moleküler yöntemle 53 adet *V.parahaemolyticus* tespit edilmiş ve 1 örnekte tdh ve trh genleri pozitif sonuç vermiştir. Moleküler yöntemle bu mikroorganizmanın tespitindeki sayı farklılıklarının, bakterinin Bacterological Analytical Manual of US (FDA)’da açıklanan biyokimyasal özelliklerinin, izolatların biyokimyasal testlerinde görülen bir ya da iki adet farklılıktan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada 18 adet *V.parahaemolyticus* izole ve identifiye edilip, biyokimyasal testlerin bu tür için verilen tanımlama tablolarına uyduğu tespit edildi.

Aydın ve Soytemiz (5), çalışmalarında üretim sahalarından alınan toplam 70 kum midyesi

(*V.gallina*) ile çalışmış ve bu örneklerin 10' unda (%14,3) *V.parahaemolyticus* izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir. Aydın ve Soytemiz (5)'in yaptığı çalışmada *Bivalvia* örneklerinin bu çalışmada örnek alınan bölgeleri kapsadığı düşünülmektedir. Bahsedilen çalışmada yaklaşık %15'e varan *V.parahaemolyticus* izole ve identifiye edilmiştir. Örneklerin Kasım- Ocak- Şubat ve Eylül dönemlerinde alındığı belirtilmiştir. Bu çalışmada Ocak ve Şubat ayında alınan hiçbir *Bivalvia* örneğinde *V.parahaemolyticus*'a rastlanmadı. Ancak Mart ve diğer aylarda alınan örneklerden *V.parahaemolyticus* izole edilmeye başlandı. Bu çalışmada kullanılan 958 örnekten sadece 18 (yaklaşık %1,9) *V.parahaemolyticus* izole edildi. Bulunan bu oran, bu çalışmada tespit edilen *V.parahaemolyticus* oranından düşük olduğu görüldü.

Yılmaz ve ark., (34), Marmara denizinden (Gelibolu bölgesi) kum midyesi (*V.gallina*) ve kara midyelerin (*M.galloprovincialis*) mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmalarda 60 örnekten 35 kara midye (*M.galloprovincialis*) ve 25 kum midyesi (*V.gallina*) kullanmışlardır. İzole edilen suşlar, konvansiyonel yöntemler ve API 20E identifikasyon sistemi ID 32 (Bio Merieux) kullanılarak identifikasyon yapılmıştır. Marmara, Gelibolu bölgesinden alınan örneklerden *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* suşları izole ve identifiye edilememiştir. Bu sonuç, çalışmamızdaki *V.cholerae* analizleri ile örtüşmektedir. Çalışmamızda 958 adet *Bivalvia* örneğinin hiçbirisinden *V.cholerae* izole edilememiş bununla birlikte, 18 adet *V.parahaemolyticus* izole edilmiştir.

Mevcut çalışma ile Yılmaz ve ark., (34)'nın çalışmasında da alınan örneklerden *V.cholerae* izole edilmemesinin, Marmara ve Ege sahil bölgelerimize kanalizasyon ve atık sularının karışmadığından dolayı olduğunu düşündürmektedir.

Sahadan alınan örnekler klasik yöntemlerle analize alınıp, elde edilen izolatların biyokimyasal testler ve Vitec II Compact (Biomerieux) cihazı kullanılarak tanımlanması yapılmıştır. Ayrıca *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* standart suşları ile serum elde edilip, izole edilen suşların serolojik yönden analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, Ege ve Marmara sahillerimizde kolera tehdidinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada *V.parahaemolyticus* izolasyonları yapılsa da, bu izolatların O:3 K:6 serotipi olmadığı se-

rolojik analizlerle tespit edilmiştir. Bu sayede bahsedilen sahil kıyılarımızda ve bu bölgelerde üretilip tüketime sunulan *Bivalvia* türlerinde O:3 K:6 serotipi yönünden ciddi gıda riski oluşturacak bir durum olmamasına rağmen, hijyen kurallarına uyulması ve gıda olarak tüketime sunulan *Bivalvia* ürünlerinin mutlaka pastörizasyona tabii tutulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma süresince gerekli örneklerin sağlanmasında kolaylık gösteren İzmir İl Kontrol Laboratuvarı çalışanlarına, kurumumda tez çalışmam için gerekli imkanı ve desteği sağlayan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Necdet AKKOCA ve Müdür Yardımcısı Hasan AKTAR'a ve özellikle görev yaptığım Gıda Kontrol Bölümündeki çalışma arkadaşlarım Dr.Vet.Hekim Özhan TÜRKYILMAZ, Uzm.Vet. Hekim Bülent KAFA, Laborant Şahin SAVA ve görüşlerinden yararlandığım Prof.Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN ve Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY'a şükranlarımı sunarım.

Kaynaklar

1. Arda M, (1997). *Temel Mikrobiyoloji*. Dördüncü baskı. Ankara: Medisan yayınları, p. 294-315.
2. Austin B, Austin DA, (1987). *Bacterial Fish Patogens*. First edition. England: Ellis Harwood Limited, p. 263- 324.
3. Austin B, Bucke D, Feist SW, Helm M, (1988). *Disease problems among cultured bivalve larva. Internal report*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research. Lowestoft. 16, 1-22.
4. Austin B, Austin DA, (2002). *Bacterial Fish Patogens*. Third edition. England: Ellis Harwood Limited, p. 282.
5. Aydın A, Soytemiz E, (2002). *Balık türlerinden ve kum midyelerinden (Venus gallina) Vibrio parahaemolyticus izolasyonu ve identifikasyonu*. Turk J Vet Anim Sci. 26, 1249-1253.
6. Bekar M, (2003). *Gram negatif mikroorganizmalar, genel karakterleri ve tanı yöntemleri*. Etlik Vet Mikrobiol Derg. 14, 31-429.
7. Bergey DH, John GH, (1984). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. First edition. Baltimore: Willams and Wilkins, p. 4320.
8. Capello AE, Romilio T, Romero EJ, (2003). *Tracing Vibrio parahaemolyticus in oysters (Tostrea chilensis) using a green fluorescent protein tag*. J Exp Mar Biol Ecol. 327, 157-166.
9. Charles F, Amouroux JM, Gremare A, Cahet G, (1992). *Filtration of the enteric bacteria Escherichia coli by two filter-feeding bivalves, Venus verrucosa and Mytilus galloprovincialis*. Mar Biol. 113, 125-131.

10. Colwell R, Listin J, (1960). *Bacteriological study of natural flora of pacific oyster (Crassostrea gigas)*. Appl Microbiol. 8, 104-109.
11. Cook DV, (1991). *Microbiology of bivalve molluscan shellfish*. Ward DR, Hackney CR. eds. Microbiology of Marine Food Products. The Microbiological Safety and Quality of Food. Aspen Publishers Inc, New York. p. 19-40.
12. Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM, Slutsker L, (2000). *Vibrio parahaemolyticus infections in the United States*. J Infect Dis. 181, 1661-1666.
13. Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibuchi M, Karunasagar I, (2003). *Application of polymerase chain reaction for detection of Vibrio parahaemolyticus associated with tropical seafoods and coastal environment*. Lett Appl Microbiol. 36, 423- 427.
14. Dungan CF, Elston RA, (1988). *Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of hinge ligaments of cultured juvenile pacific oyster Crassostrea gigas*. Aquaculture. 72, 1-14.
15. FDA BAM, (2004). U.S. Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual Online chapter: 9*. Erişim adresi: www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9html, Erişim tarihi: 23.11.2007.
16. Gürgün V, Halkman K, (1990). *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri*. İkinci baskı. Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği, p. 1-6.
17. Hayashi S, Okura M, Osawa R, (2006). *Soft agar coated filter metod for early detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH)- or TDH- related hemolysin producing Vibrio parahaemolyticus in seafood*. Appl Environ Microbiol. 72, 4576- 4582.
18. ISO/TS 21872-1:2007(E), (2007). *First edition, Interpretation of biochemical tests, Microbiology of food and animal feeding stuffs , Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae*. Erişim adresi: www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=38279-11, Erişim tarihi: 23.11.2007.
19. Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL, (1988). *Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant Vibrio spp*. Clin Microbiol Rev. 1, 245-267.
20. Kueh CW, Tamplin M, (1985). *Bacteria in bivalve shellfish with special reference to oysters*. Appl Bacteriol. 59, 41-47.
21. Le Gall S, Hassen MB, Le Gall P, (1997). *Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster Crassostrea gigas: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders*. Mar Ecol Prog Ser. 152, 301- 306.
22. Marano NN, Daniels NA, Easton AN, McShan A, Ray B, Wells JG, Griffin PM, Angulo FJ, (2000). *A survey of stool culturing practices for Vibrio species at clinical laboratories in gulf coast states*. J Clin Microbiology. 38, 2267- 2270.
23. Nicholas JL, Ansquer D, Cochard DS, (1992). *Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam Tapes philippinarum larvae*. Dis Aqua Organisms. 14, 153-159.
24. OIE, (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Erişim adresi: www.oie.int/eng/normes/mmanal/a_00063.htm, Erişim tarihi: 13.11.2009.
25. Olafsen JA, Mikkelsen HV, Giaever H, Hanse GH, (1993). *Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures*. Appl Environ Microbiol. 59, 1848- 1854.
26. Paster B, Pelletier DA, Dewhurst FE, Weistburg WG, Fussing V, Poulsen LK, Dannenberg S, Schroeder I, (1996). *Phylogenetic position of spirochetal genus Cristispira*. Appl Environ Mic. 62, 942-946.
27. Prieur D, (1987). *A review of the relationships between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment*. Symbiosis. 4, 37-50.
28. Tubiash HS, Chanley PE, Leifson E, (1965). *Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile mollusks*. J Bacteriology. 90, 1036-1044.
29. Volety A, McCharty SA, Tall BD, Curtis SK, Fsiher WS, Genthner FJ, (2001). *Responses of oyster Crassostrea virginica hemocytes to environmental and clinical isolates of Vibrio parahaemolyticus*. Aquat Microb Ecol. 25, 11-20.
30. Vora GJ, Meador CE, Bird MM, Bopp CA, Andreadis JD, Stenger DA, (2005). *Microarray- based detection of genetic heterogeneity antimicrobial resistance and the viable but nonculturable state in human pathogenic Vibrio spp*. Proc Natl Acad Sci. 102, 19109- 19114.
31. Walne PR, (1958). *The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of Ostrea edulis*. J Marine Biol Ass. 37, 415-425.
32. Wright RT, Coffin RB, Persing C, Pearson D, (1982). *Field and lab. measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton*. Limnol Oceanogr. 27, 91-98.
33. Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman MC, Colwell RR, Morris JR, (1996). *Distribution of Vibrio vulnificus in the Chesapeake Bay*. Appl Environ Microbiol. 62, 717- 724.
34. Yılmaz İ, Bilgin, Öktem B, (2003). *Occurrence of Vibrio and other pathogenic bacteria in Mytilus galloprovincialis and Venus gallina harvested from the Marmara sea*. Turk J Vet. Anim Sci. 29, 409-415.

Aynalı sazan balığı (*Cyprinus carpio carpio* L., 1758) kıymasından hazırlanan köftelerin raf ömrü üzerine timol'ün etkisi

Özlem Pelin CAN¹, Özlem EMİR ÇOBAN²

¹Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sivas
²Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü, Elazığ

Geliş Tarihi / Received: 27.03.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 11.05.2012

Özet: Bu çalışmada, aynalı sazan balığından (*Cyprinus carpio carpio* L., 1758) elde edilen kıymaya çeşitli katkı maddeleri ilave edilerek balık köftesi yapılmıştır. Köfteler biri kontrol (grup A), diğerlerine %0.5 (grup B) ve %1 (grup C) oranlarında timol sürülerek üç gruba ayrılmıştır. Hazırlanan köfteler 4°C'de depolanarak, muhafazanın 1, 3, 7, 9 ve 12. günlerinde mikrobiyolojik (toplam mezofil bakteri sayısı, toplam psikrofil bakteri sayısı, *enterobakteri* sayısı, maya ve küf sayısı) kimyasal (pH, total volatil baz miktarı ve tiobarbitürikasit sayısı) ve duyuşal açıdan incelenmiştir. Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına göre A grubu B ve C grubuyla karşılaştırıldığında değerler yüksek bulunmuştur (P<0.05). İstatistiksel olarak C grubu örneklerinde *enterobakteriler*, mezofil aerob bakteri, maya ve küf ve sayısı daha düşük bulunmuştur (p<0.05). TVB-N ve TBA değerleri üç grupta muhafaza süresi boyunca yükselmiştir. Duyusal değerlendirilmede, B ve C grubu örnekleri arasında fark görülmemiştir (p>0.05).

Anahtar kelimeler: Aynalı sazan balığı, timol, köfte, raf ömrü.

The effect of thyme on the storage time of fish balls prepared from mirror carp (*Cyprinus carpio carpio* L.,1758)

Summary: In this study, *Cyprinus carpio carpio* L.,1758 from the fish balls were made by adding various additives. Fish balls is divide into three groups which one of group control (A group), others thyme by applying 0.5%(group B) and 1%(group C). By prepared meat ball storage at 4°C, microbiological (total mesophile bacteria, total psychrotrophic bacteria, *enterobacteriaceae*, yeast and mould count), chemical (pH, total volatile basic nitrogen and thiobarbituric acid) and sensory changes were examined storage day on 1, 3, 7, 9. and 12. According to the results of microbiological analysis of group A compared with group B and C values were higher (p<0.05). *Enterobacteria* statistical samples in the C group, mesophilic aerobic bacteria, yeast and molds counts were lower (p<0.05). TVB-N and TBA values increased during storage period in three groups. At the sensory analysis, not significant between C and B groups.

Key words: Carp fish, thyme, meat ball, storage time.

Giriş

Balığın kalitesi, üreticiden tüketiciye uzanan zincirde avlama, işleme, depolama gibi aşamalarda uygulanan çeşitli işlemlerin niteliklerine bağlı olarak önemli ölçüde etkilenmektedir (16). Taze soğutularak raf ömrü uzatılmış gıdalara olan tüketici talepleri yüzünden birçok araştırma, taze ürünlerin güvenliğini garantilerken, su ürünlerinde de raf ömrünü uzatmak amacı ile çeşitli muhafaza teknolojilerinin kullanımını gündeme getirmiştir (15). Gün geçtikçe değişen beslenme alışkanlıkları, hazırlanması ve tüketimi kolay olan ürünlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Gıda işleme yöntemlerindeki gelişmeler ile yeni ürünlerin elde edilmesinin yanında, elde edilen ürünlerin dayanma süresinin uzatılması ve

kalitenin korunması amaçlanmaktadır. Bu sayede belirli dönemlerde bol olarak temin edilebilen gıda maddelerinin daha az buldukları veya hiç bulunmadıkları dönemlerde de kullanılması sağlanmaktadır (22).

Son zamanlarda gıdalarda sentetik maddelerin kullanımını artmıştır. Bu maddelerin kanserojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkmasıyla bunların yerine doğal esansiyel yağların kullanılması günümüzde yaygınlık kazanmıştır. Esansiyel yağlar, tek başlarına ya da diğer muhafaza yöntemleriyle birlikte kullanıldıklarında, gıdaların raf ömrünü artıran doğal antimikrobiyel maddelerdir. Timol esansiyel yağ olup, gıda katkı maddesi olarak Avrupa Birliği tarafından kullanımına izin verilen insan sağlığı

üzerinde olumsuz herhangi etkisi olmayan bir maddedir. Timol kekiğe kokusunu veren ve antioksidan özellik kazandıran fenolik bir bileşiktir. Düşük konsantrasyonlarda aroma ve lezzet üzerine de etkili olabilmektedir. Antimikrobiyal özelliklerini fonksiyonel hidroksil grupları ve yüksek redoks potansiyelleri sayesinde göstermektedirler. Bunlar, patojen mikroorganizmaların hücre içindeki protonlarının hücre dışı sıvısına geçişini arttırarak (böylece hücre içi pH'sını arttırırlar), ayrıca onların hücre zarı ve sitoplazmik zarlarını parçalayarak ölmelerine sebep olurlar. Gıda bileşenleri ve diğer katkı maddeleri ile sinerjistik etki gösterdiği de bilinmektedir (4).

Bu çalışma, ülkemizde çok fazla yetişen fakat az tüketilen aynalı sazan balığı etinden daha fazla faydalanmak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca hazır gıda olarak köfte tüketimi özellikle gençler ve çocuklar arasında oldukça yaygındır. Bu gruptaki insanların yeterli balık eti tüketimi balık etinin köfte haline getirilmesiyle başarılabilir düşünlümlenmektedir. Bu amaçla hem tüketimi az olan sazan balığı kullanılarak ekonomiye fayda sağlamak hem de köfte haline getirerek balık eti tüketimini arttırmak çalışmamızdaki temel hedeflerdendir. Doğal bir katkı maddesi olan timol kullanılarak da insan sağlığının korunması da amaçlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan balık köftelerinin muhafaza süresi uzatılarak teknolojik bir ürün haline dönüştürülebileceği düşünülmektedir.

Materyal ve Metot

Materyal: Bu çalışmanın materyalini oluşturan aynalı sazan balıkları Keban Baraj Gölü'nden temin edilmiştir. Yaklaşık 10 kg ağırlığında olan balıklar avlandıktan hemen sonra soğuk zincir altında Cumhuriyet Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarına getirilmiştir. Balıkların önce derileri soyulmuş, daha sonra başları kesilerek iç organları temizlenmiştir. Filetoları çıkarılarak, fileto içerisindeki kalın kılçıklar ayıklanmıştır. Et kılçıklarından temizlendikten sonra ayna delik çapı 3 mm olan kıyma makinesinden geçirilerek kıyma haline getirilmiştir.

Köftelerin hazırlanması: Köfte yapılırken balık etine çeşitli baharatlar (balık ağırlığı göz önünde bulundurularak) %2 tuz, %1 karabiber, %1 kırmızı biber, %1 kimyon ve %1 soğan katılmıştır. 20 g ağırlıklara ayrılan köfte hamuru, 6 cm çapında 3 cm derinliğinde paslanmaz çelik çember biçimindeki

kalıplara konarak şekillendirilmiş ve strofor kaplara konarak streç film ile kaplanmıştır. Örnekler 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol (grup A) olup, timol ilave edilmemiştir. B grubunu oluşturan köftelerin yüzeyine köfte ağırlığının %0.5' i kadar timol 1 ml sıvı yağ ile karıştırılıp tüm köftenin yüzeyine aseptik olarak, çapraz kontaminasyonu önleyecek şekilde fırça ile sürülmüştür. Her köfte için bu işlem ayrı ayrı uygulanmıştır. Yine C grubu örnekleri hazırlanırken köfte ağırlığının %1 kadar timol 1 ml sıvı yağ ile karıştırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Köfte örnekleri hazırlanırken çapraz kontaminasyonları önlemek için aseptik şartlara uyulmaya çalışılmıştır.

Metot: Mikrobiyolojik analizler için, köfte örnekleri bir parçalayıcının (Stomacher 400) özel torbasında 10 g tartılmış ve üzerine steril %0.1'lik peptonlu sudan 90 ml ilave edilerek parçalayıcıda homojen hale getirilmiştir. Böylece örneğin 10-1 (1/10)'lik dilüsyonu hazırlanmıştır. Örneklerin her seyreltisinden 1'er ml kullanılarak iki seri halinde plak dökme metoduyla ekimleri yapılarak inkübasyon süresi sonunda 30-300 koloni içeren plaklar değerlendirilmiştir. Örneklerdeki toplam mezofilik aerob mikroorganizmaların (TMAB) sayımı için Plate Count Agar (PCA) (30±1 °C'de 72 saat), psikrofil bakteri sayımı için Plate Count Agar (PCA) (7±1 °C'de 7 gün) enterobakterilerin sayımı için Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (37±1 °C'de 24 saat), maya ve küf sayımları için %10' luk tartarik asit ilave edilerek hazırlanmış Patato Dextrose Agar (22±1 °C'de 5 gün) kullanılmıştır (9).

Kimyasal analiz yapılırken, örneklerin pH değerleri pH metre ile ölçülmüştür (3). TVB-N miktarının belirlenmesinde, Varlık ve ark.'nın (20) bildirdiği spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. TBA sayısı ise, 1000 g örnekteki malonaldehit miktarı üzerinden hesaplanmıştır (17). Kimyasal ve mikrobiyolojik analizler muhafazanın 1., 3., 5., 7.,9. ve 12. gününde yapılmıştır.

Kızartılan köfte örnekleri renk, görünüş, koku, gevreklik, lezzet ve genel beğeni düzeyi yönünden 8 kişilik uzman panelist grup tarafından değerlendirilmiştir. Panelistlerin seçiminde kişilerin bu tarz panel tecrübeleri göz önüne alınarak su ürünleri işleme konusunda bilgi sahibi kişiler seçilmiştir. Panelistlere timol hakkında bilgi verilerek ürünün tanıtımı yapılmış ve her grup ürün farklı bir harfle kodlanarak analize alınmıştır. Değerlendirmede 1

ile 5 arasında puanlama yapılmıştır. Puanlamada 1-5 arası puan verilerek, 1 çok kötü, 2 kötü, 3 normal, 4 iyi ve 5 çok iyi olarak değerlendirilmiştir (11).

Verilerin analizi, Statistical Analysis System (SAS) paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası ve grup içi günler arası değerler karşılaştırıldı. Veriler “ tekerrür sayısı x örnekleme zamanı x test grupları x her test grubundan bir seferde incelenen örnek sayısı “ olacak şekilde 3x1x3x1 faktöriyel dizayna uygun olarak fix etkiler ve değişkenler arası

interaksiyonlar yönünden varyans analizine tabi tutuldu. General Linear Models (GLM) prosedürüne göre, Fisher’ in en düşük kareler ortalamaları (LSD) testi kullanıldı. Tüm ortalamaların standart sapma değerleri hesaplandı (2). Alfa değeri 0.05 olarak belirlendi.

Deneysel örneklere ait mikrobiyolojik analiz bulguları Tablo 1’ de, kimyasal analiz bulguları Tablo 2’ de ve duyu analizi bulguları ise Tablo 3’ de verilmiştir.

Tablo 1. 4±1 °C’de muhafaza edilen köfte örneklerinin mikrobiyolojik analiz bulguları (log10kob/g).

Mikroorganizma	Örnek	Muhafaza Süresi (gün)				
		1	3	7	9	12
TMAB	A	3.46 ^{b,z}	4.31 ^{b,z}	6.22 ^{ab,z}	7.29 ^{a,z}	*
	B	3.01 ^{b,z}	3.63 ^{b,zy}	4.23 ^{b,zy}	5.49 ^{ab,y}	6.57 ^{a,z}
	C	2.85 ^{a,z}	2.51 ^{a,y}	3.02 ^{a,y}	3.80 ^{a,x}	3.67 ^{a,y}
PB	A	2.83 ^{b,z}	3.13 ^{b,z}	3.56 ^{a,z}	4.42 ^{a,z}	*
	B	2.21 ^{b,z}	2.83 ^{b,z}	3.21 ^{a,z}	3.86 ^{a,z}	3.73 ^{a,z}
	C	2.33 ^{a,z}	1.93 ^{a,y}	2.21 ^{a,y}	2.56 ^{a,y}	2.82 ^{a,y}
<i>Enterobakteri</i>	A	2.71 ^{b,z}	3.12 ^{ab,z}	3.63 ^{a,z}	4.06 ^{a,z}	*
	B	2.43 ^{a,z}	2.49 ^{a,z}	2.72 ^{a,y}	2.47 ^{a,y}	3.11 ^{a,z}
	C	2.36 ^{a,z}	2.91 ^{a,z}	2.89 ^{a,y}	2.83 ^{a,y}	2.51 ^{a,z}
Maya-Küf	A	3.13 ^{b,z}	3.56 ^{b,z}	4.71 ^{a,z}	5.46 ^{a,z}	*
	B	3.22 ^{a,z}	3.9 ^{a,z}	3.62 ^{a,y}	4.61 ^{a,y}	4.23 ^{a,z}
	C	3.17 ^{a,z}	3.11 ^{a,z}	3.22 ^{a,y}	3.18 ^{a,x}	3.14 ^{a,y}

A: %0 timol, B: %0.5 timol, C: %1 timol, *: Analiz yapılmadı. a, b: Aynı sırada farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan farklıdır (P<0.05). z, y, x: Aynı sütünde farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan farklıdır (P<0.05).

Tablo 2. 4±1 °C’de muhafaza edilen köfte örneklerinin kimyasal analiz bulguları.

Değer	Örnek	Muhafaza Süresi (gün)				
		1	3	7	9	12
pH	A	6.2 ^{a,z}	6.24 ^{a,z}	6.414 ^{a,z}	6.56 ^{a,z}	*
	B	6.17 ^{a,z}	6.1 ^{a,z}	6.2 ^{a,z}	6.1 ^{a,z}	6.1 ^{a,z}
	C	6.13 ^{a,z}	6.2 ^{a,z}	6.1 ^{a,z}	6 ^{a,z}	6.2 ^{a,z}
TVB-N (mg/100g)	A	7.2 ^{c,z}	14.8 ^{b,z}	18 ^{b,z}	36.4 ^{a,z}	*
	B	7.4 ^{b,z}	8.2 ^{b,z}	10.2 ^{b,z}	22.4 ^{a,y}	25.4 ^{a,z}
	C	7.2 ^{a,z}	8.7 ^{a,z}	9 ^{a,z}	12.4 ^{a,x}	12.4 ^{a,y}
TBA (mg MDA/kg)	A	0.83 ^{b,z}	1.4 ^{b,z}	2.2 ^{ab,z}	3.8 ^{a,z}	*
	B	0.86 ^{b,z}	0.94 ^{b,z}	1.8 ^{a,y}	2.4 ^{a,y}	2.8 ^{a,z}
	C	0.84 ^{a,z}	0.82 ^{a,z}	1.12 ^{a,y}	1.5 ^{a,y}	1.4 ^{a,y}

A: %0 timol, B: %0.5 timol, C: %1 timol, *: Analiz yapılmadı. a, b: Aynı sırada farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan farklıdır (P<0.05). z, y, x: Aynı sütünde farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan farklıdır (P<0.05).

Tablo 3. 4 ± 1 °C’de muhafaza edilen köfte örneklerinin duyusal analiz bulguları

Özellik	Örnek	Muhafaza Süresi (gün)			
		1	3	7	9
Renk	A	4.6 ^{a,z}	4.4 ^{a,z}	4 ^{a,z}	*
	B	4.6 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	4.8 ^{a,z}
	C	4 ^{a,z}	3.8 ^{a,z}	4 ^{a,z}	3.8 ^{a,z}
Koku	A	4.6 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	*
	B	4 ^{a,z}	4.2 ^{a,z}	4.3 ^{a,z}	4.2 ^{a,z}
	C	3 ^{a,y}	2.8 ^{a,y}	2.8 ^{a,y}	2.8 ^{a,y}
Gevreklilik	A	4.8 ^{a,z}	4.8 ^{a,z}	4.4 ^{a,z}	*
	B	4.8 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}
	C	4.7 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.7 ^{a,z}
Lezzet	A	4.8 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	*
	B	4.4 ^{a,z}	4.3 ^{a,z}	4.3 ^{a,z}	4.44 ^{a,z}
	C	3.8 ^{a,y}	3 ^{a,y}	3 ^{ab,y}	3 ^{b,y}
Görünüş	A	4.7 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	*
	B	4.4 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}
	C	4.4 ^{a,z}	4.3 ^{a,z}	4.3 ^{a,z}	4.4 ^{a,z}
Genel beğeni düzeyi	A	4.6 ^{a,z}	4.6 ^{a,z}	4.5 ^{a,z}	*
	B	4.5 ^{a,z}	4.6 ^z	4.6 ^{a,z}	4.4 ^{a,z}
	C	3.74 ^{a,y}	3.8 ^{a,z}	3.9 ^{a,z}	3.6 ^{a,z}

A: %0 timol, B: %0.5 timol, C: %1 timol, * : Analiz yapılmadı. a, b: Aynı sırada farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan farklıdır (P<0.05). z, y, x: Aynı sütünde farklı üst simgeyi taşıyanlar istatistiksel bakımdan farklıdır (P<0.05).

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada aynalı sazan balığından (*Cyprinus carpio carpio* L., 1758) deneysel olarak üretilen köftelere timol uygulanarak; timolün balık köftelerinin raf ömrü üzerine etkileri incelenmiştir. Mikrobiyolojik analizler A grubu örneklerinde muhafazanın 9. diğer gruplarda ise 12. gününe kadar yapılmıştır. Çünkü adı geçen muhafaza gününde TMAB sayısı ICMSF tarafından belirlenen limit değeri (log 10⁷) aşmıştır (10). Deneysel örneklerde belirlenen toplam mezofil aerob bakteri sayısı (TMAB) değerlendirildiğinde, A ve B grubu örneklerinde grup içi günler arasındaki farkın önemli olduğu (p<0.05), C grubu örneklerde ise önemsiz olduğu (p>0.05) tespit edilmiştir. Yine muhafazanın 9. gününde her üç grup arasındaki farkın önemli olduğu (p<0.05) bulunmuştur. Balık etinden yapılan köftelerin raf ömrünü uzatmak için çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Örneğin, Öksüztepe ve ark. (13), %2 oranında

da sodyum laktat ilave edilmiş balık köftelerinde TMAB sayısını 8.80 log₁₀ kob/g olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Çetin ve ark. (6), sodyum laktat ilave edilmiş köftelerde, sodyum laktat miktarının artmasının ürünün raf ömrünü uzattığını rapor etmişlerdir. Bu durum mevcut çalışma bulgularını desteklemektedir. Tokur ve ark. (19), yaptıkları balık köftelerini -18 °C’de muhafaza altına almışlar ve çalışma sonucunda (5 aylık muhafaza periyodu) TMBA sayısının 10⁶ kob/g değerine ulaşmadığını belirtmişlerdir.

Aynalı sazan köftelerinde, psikrofil bakteri sayısı bakımından C grubu örneklerinde muhafaza süresi boyunca büyük değişiklikler görülmemiş ve diğer iki grup arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Özyılmaz (14), kekik esansiyel yağının alabalık filetolarında bulunan psikrofilik bakterilerin faaliyetlerini yavaşlattığını bildirmiştir. Bu bulgu mevcut çalışma bulgularını desteklemek-

tedir. *Enterobakteri* sayısı timol içeren deneysel gruplarda istatistiki açıdan farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). A grubu örneklerinde muhafazanın 9. gününde *enterobakteri* sayısı $4.06 \log_{10}$ kob/g olarak tespit edilmiştir. Timol uygulanan deneysel gruplarda *enterobakteri* sayısı yükselmemiştir. Esansiyel yağların *enterobakterilerin* gelişmelerini engelleyici etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (4, 5). Aynalı sazan balığı filetolarına timol uygulanan bir çalışmada, muhafaza süresi sonunda (21 gün), filetolarda belirlenen *enterobakteri* sayısı $10^{4.7}$ ün altında olduğu rapor edilmiştir. (4). Maya ve küfler, balıklarda normal flora içerisinde bulunmazlar. Bunlar genellikle toprak orijinli olup, balıklar avlandıkları anda, sudan veya avlanma sonrası kullanılan alet ve malzemelerden bulaşmaktadırlar. Örneklerde belirlenen maya-küf sayısı değerlendirilecek olursa timol' ün bu kriter üzerine etkili olduğu ve C grubu örnekleri ile B grubu örnekleri arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Aynalı sazandan üretilen köftelerin pH analizinde, her üç grupta da farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$), (Tablo 3). Deneysel olarak hazırlanan örneklerdeki pH değerleri tüketilebilir sınır değerlerine (6.8-7) uygun bulunmuştur, Yanar ve Fenercioğlu'nun (21) çalışmasıyla benzerlik göstermiştir. Tokur ve ark. (18), sazan kıymasından yapmış oldukları çalışmada ilk dört aya kadar pH değerinde bir değişim olmadığını, muhafazanın son ayında ise pH değerinde belirgin bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Yanar ve Fenercioğlu'nun (21) sazan etinden yaptıkları köftelerde tespit ettikleri 6.1 ile 6.3 değeri ile Akkuş ve ark.'nın (1) hamsi etinden yaptıkları köftelerde tespit ettikleri 6.3 ile 7.7 değerleri hemen hemen araştırmadaki bulgularımız ile bağdaşmaktadır.

Timol uygulanan örnekler TVB-N değeri açısından değerlendirildiğinde, tüketilebilirlik sınır değeri olarak kabul edilen 32-36 mg / 100 g değerinin oldukça altında olup, tüketilebilir ürün sınıfına girmektedir (20). TVB-N değeri A grubu örneklerinde muhafaza süresi boyunca yükselerek 9. günde 30 mg/100 g değerini aşmıştır. Yine bu kriter değerlendirildiğinde 12. günde B ve C grubu örnekleri arasında istatistiki açıdan fark görülmüştür ($p<0.05$). Mahmoud (12), timol ve karvakrola daldırdığı sazan balığı filetolarının 5°C 'de 12. gün muhafaza süreci sonunda TVB-N değerini 30 mg / 100 g ol-

duğunu bildirmiştir. Erkan (7), çalışmasında levrek filetolarına kekik yağı uygulamış ve 13. günde 6.45 mg / 100 g tespit etmiştir. Belirtilen araştırmaların (7, 12) TVB-N değerleri, aynalı sazan köftelerinden elde edilen bulgular ile uyum içinde olduğu gözlenmektedir.

Balık etinde bozulmanın en önemli ölçütlerinden biri olan TBA değeri yağ oksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. TBA içeriğinin tüketilebilirlik sınır değeri, 7-8 mg MDA / kg arasında olup balık etinde 4 mg MDA / kg'ı aştığı zaman acılaşmanın başladığı bildirilmiştir (20). TBA değeri çalışma sonuçlarımıza göre, tüm gruplarda muhafaza süresince tüketilebilirlik sınırlarının altında olduğu tespit edilmiştir. Örneklerde tespit edilen TBA sayısı, timol içeren gruplarda çok fazla artış göstermemiştir. C grubu örneklerinde en düşük TBA sayısı tespit edilmiştir. Ayrıca C grubu ile B grubu örnekleri arasındaki istatistiki fark muhafazanın son gününde dikkati çekmektedir ($p<0.05$). Fernandez-Lopez (8), biberiye, limon ve portakal yağlarının köftelerdeki antimikrobiyel ve antioksidan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kontrol grubunun TBA miktarındaki artışın diğer gruplara göre fazla olduğunu ayrıca bu esansiyel yağların muhafaza süresine önemli etkilerinin ($p<0.05$) olduğunu saptamışlardır.

Yapılan duyuusal analizlerde B grubu örnekleri C grubu örneklerine göre daha yüksek puanlar almıştır (Tablo 3). B ve C grubu örnekleri A grubu örnekleri ile duyuusal açıdan mukayese edildiğinde sonuçlar çok farklı bulunmamıştır. Timol' ün sazan balığından yapılan köfteleri olumsuz etkilemediği söylenebilir.

Yapılan analizler bir bütün olarak incelenecek olursa timol içeren grupların kontrol grubuna göre mikrobiyolojik açıdan daha uzun muhafaza edildiği tespit edilmiştir. Timolün antibakteriyel etkisinin konsantrasyona bağlı olarak daha etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca kimyasal analizlerde de yine konsantrasyon artışına bağlı etkinin daha iyi olduğu sonucu da tespit edilmiştir. Yapılan duyuusal analizlerde timol içeren gruplar reddedilmemiş, hatta iyi sonuçlar almıştır.

Sonuç olarak, aynalı sazan balığı etinden köfte yapılarak, aynalı sazan balığı tüketimi artırılıp ekonomiye katkı getirebileceği söylenebilir. Balık etinden köfte üretimi balığın değişik üretim metotlarıyla değerlendirilmesini sağlamanın yanı sıra gıda

sektöründe çeşitliliği artırması ve balık tüketmekten hoşlanmayan bireylerin kabul edilebilir ürünle tanışmasını sağlaması bakımından önemli olabileceği düşünülmektedir. Balık köftelerine ilave edilen timol ile ürünün raf ömrü uzatılmıştır. Aynalı sazan köftelerine ilave edilen timolün, ürünün duyuusal kalitesi üzerine olumsuz bir etki oluşturmaması gıda maddelerinin mikrobiyolojik güvenliğini sağlamak ve raf ömrünü artırmak için esansiyel yağ ve türevlerinden doğal alternatifler olarak faydalanabileceğimizi göstermektedir.

Kaynaklar

1. Akkuş Ö, Varlık C, Erkan N, Mol S, (2004). Çiğ ve haşlanmış balık etinden yapılmış köftelerin bazı kalite parametrelerinin incelenmesi. Turk J Vet Anim Sci. 28, 79-85.
2. Anonim, (1996). *Statistical analysis system (Version 6.1)*. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USD.
3. Association Official Analytical Chemists (AOAC), (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. 15th edition. Washington DC. Academic Press.
4. Can ÖP, (2011). *Combine effect of salting and thyme (Thymus vulgaris) essential oil on shelf life of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) stored at 4 °C*. Bulletin. 55, 435-442.
5. Can ÖP, Yalçın H, Arslan A, (2011). *Farklı sürelerde öjenol'ü salamura solüsyonunda bekletilen aynalı sazan balığı (Cyprinus carpio carpio L., 1758) filetolarının kalite kriterlerinin değerlendirilmesi*. Fisheries and Aquatic Sciences Balıkçılık ve Akuatik Bilimler 2011 Sempozyumu (FABA 2011), Eylül, 125, Samsun, Türkiye.
6. Çetin B, Bostan K, (2002). *Hazır köftelerin mikrobiyolojik kalitesi ve raf ömrü üzerine sodyum laktatın etkisi*. Turk J Vet Anim Sci. 26, 843-848.
7. Erkan N, Tosun ŞY, Ulusoy Ş, Üretener G, (2011). *The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (Pomatomus saltatrix) during storage in ice*. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 6, 39-48.
8. Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez-Alvarez JA, Kuri V, (2005). *Antioksidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs*. Maet Science. 69, 371-380.
9. Harrigan WF, (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. Third edition. London: Academic Pres.
10. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), (1986). *Sampling plans for fish and shellfish*. In: *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*. 181-196.
11. Kurtcan Ü, Gönül M, (1987). *Gıdaların duyuusal değerlendirilmesinde puanlama metodu*. Ege Univ Müh Fak Derg. 5, 137-146.
12. Mahmoud BSM, Yamazaki K, Miyashita K, Shin IS, Dong-Suk C, Suzuki T, (2004). *Bacterial microflora of carp (Cyprinus carpio) and its shelf-life extension by essential oil compounds*. Food Chemistry. 21, 656-662.
13. Öksüztepe G, Çoban ÖE, Güran HŞ, (2010). *Sodyum laktat ilavesinin taze gökkuşağı alabalığından (Oncorhynchus mykiss W.) yapılan köftelere etkisi*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16, (Suppl-A), 65-72.
14. Özyılmaz A, (2007). *Gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1972) filetolarında kekik eterik yağı kullanımının raf ömrü üzerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
15. Sallam KI, Ahmed AM, Elgazzar M, Eldaly EA, (2007). *Chemical quality and sensory attributes of marinated pacific saury (Cololabis saira) during vacuum-packaged storage at 4°C*. Food Chemistry. 102, 1061-1070.
16. Serdaroğlu M, Purma Ç, (2006). *Su ürünlerinde kalitenin saptanmasında kullanılan hızlı teknikler*. E Ü Su Ürünleri Dergisi. 23, 495-496.
17. Tarladgis BG, Watts BM, Younnathan MT, Dugan LR, (1960). *A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods*. J Am Oil Chem Soc. 37, 44-48.
18. Tokur B, Polat A, Beklevik G, Özkütük S, (2004). *The quality changes of tilapia (Oreochromis niloticus) burger during frozen storage*. European Food Research and Tech. 218, 420-423.
19. Tokur SÖ, Esin A, Özyurt G, Özyurt CE, (2006). *Chemical and sensory quality changes of fish fingers, made from mirror carp (Cyprinus carpio L., 1758), during frozen storage (-18 °C)*. Food Chemistry. 99, 335-341.
20. Varlık C, Erkan N, Özden Ö, Mol S, Baygar T, (2004). *Su ürünleri işleme teknolojisi*. Yedinci baskı. İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul.
21. Yanar Y, Fenercioğlu H, (1999). *Sazan (Cyprinus carpio) etinin balık köftesi olarak değerlendirilmesi*. Turk J Vet Anim Sci. 23, 361-365.
22. Yapar A, (1998). *İki farklı olgunlaştırma çözeltisi kullanarak hazırlanan hamsi (Engraulis encrasicolus, L., 1758) marinatlarında bazı kalite değişimleri*. E Ü Su Ürünleri Dergisi. 15, 1-7.

Köpek ve kedilerde kuduz antikor titre tayininin retrospektif değerlendirilmesi

Nil ÜNAL¹, Orhan AYLAN¹, Hikmet ÜN¹, Conrad FREULING², Thomas MÜLLER²

¹Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

²Institute of Epidemiology, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research, Friedrich-Loeffler-Institute, Wusterhausen, Germany

Geliş Tarihi / Received: 11.05.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 15.06.2012

Özet: Bu çalışma, 2005-2010 yılları arasında Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarına kuduz antikor titre tesbiti için gönderilen köpek ve kedi orijinli kan serumları sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çoğunlukla Ege, Akdeniz ve Marmara bölgesi olmak üzere 24 farklı ilden gelen, toplam 8776 kan serumu çalışılmıştır. Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN) testi kullanılarak, 8126 (%92.6) adet serum örneğinde, serum anti kuduz antikor varlığı istenilen düzeyde (≥ 0.5 IU/ml) bulunmuştur. Yine 650 (%7.4) adet serum örneğinde ise anti kuduz antikorların varlığı istenilen düzeyin (< 0.5 IU/ml) altında bulunmuştur. Koruyuculuk kriteri olarak kabul edilen 0.5 IU/ml sonuçlar; tür, yaş ve aşılama tarihleriyle ilişkili olarak yıllara göre değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Türkiye, kuduz antikorları, kedi, köpek, favn, aşı.

Retrospective evaluation of the rabies antibody titre determination in dogs and cats

Summary: This study was carried out in order to evaluate the analysis of blood serum samples with canine and feline origin sent to Rabies Diagnostic Laboratory at Central Veterinary Control and Research Institute in Ankara Turkey between 2005 and 2010. During this period of time, a total of 8776 units of blood serum using Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN) test, from 2 provinces in mainly Aegean, Mediterranean and Marmara regions were examined. Often the Aegean, the Mediterranean and the Marmara region in 24 different provinces, including a total of 8776 blood serum were examined. In 8126 serum samples (which makes 92.6% of the whole lot) the presence of rabies serum antibodies was found at the desired level meaning more than or equal with 0.5 IU/ml (≥ 0.5 IU/ml). The rest 650 serums (which makes the 7.4% of the samples) contains rabies serum antibodies below the desired level which means less than 0.5 IU/ml (< 0.5 IU/ml). Results determined by 0.5 IU/ml adopted criterion of protectiveness, were assessed in relation to age, species, and vaccination dates. 0.5 IU/ml results adopted as a criterion of protectiveness, were evaluated in relation to the species, age and vaccination dates.

Key words: Turkey, rabies antibodies, cat, dog, favn, vaccination.

Giriş

Kuduz, bütün sıcakkanlı hayvanlarda ve insanlarda, enzootik ve hatta epizootik olarak ortaya çıkan, akut seyirli öldürücü ensefalomyelitik karakterde viral bir hastalıktır. Etken *Rhabdoviridae* ailesi içinde *Lyssavirus* cinsinde yer alır (2,3,20). Hastalık, hayvandan hayvana veya hayvandan insana direkt ısırma ile bulaşır. Ayrıca mevcut yaralara enfekte salyanın bulaşması ile de enfeksiyon meydana gelmektedir (2,3,8).

Enfeksiyon, kentsel ve kırsal olmak üzere, iki ilgili siklus arasında devamlılık arz etmektedir. Kırsal kuduz, özel yerleşimlerde bir ya da iki başlıca türün (küçük karnivorlar vb.) sorumlu tutulma-

sı ile karakterizedir ve bu durum yıllar boyu sürer. Başboş ve evcil olmayan kedi ve köpekleri etkileyen şehir kuduzu, insanlar için en tehlikeli olan kuduz şeklidir. Bu tüm bildirilmiş kuduz olaylarının %99 unu teşkil eder (2,3,12)

Tüm dünyada yaygın bir enfeksiyon olan kuduz özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde önemli mortalite nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (3,20). Hastalık bazı ülkeler hariç (Antarktika, Yeni Zelanda, Japonya, Tayvan, İsveç, Norveç, İspanya, bazı Karayip Adaları) tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre her yıl dünyada yaklaşık dört milyon insana kuduz profilaksisi uy-

gulanmakta ve bunların yaklaşık 55.000'i yaşamını yitirmektedir (17,18,19).

Ülkemiz kuduz enfeksiyonu yönünden, halen endemik bir bölgedir. Sağlık Bakanlığının verilerine göre ülkemizde, 1973 yılında kuduz mortalite oranı, bir milyonda 1,05 iken bu oran 2006 yılına gelindiğinde bir milyonda 0,02'e gerilemiştir. Yılda yaklaşık 180.000 kişi şüpheli ısırık olgusuna maruz kalma sonrası aşılama için sağlık kuruluşlarına başvurmaktadır (18). Yine ülkemizde Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (VKMAE) kayıtlarına göre çeşitli hayvan türlerin de yılda ortalama 300 kuduz vakası tesbit edilmiştir.

İnsanlarda ve hayvanlarda kuduzun önlenmesi açısından kuduz virusüne karşı profilaktik aşı uygulamaları oldukça önleyici ve etkili bir yöntemdir. WHO ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE), tarafından kabul edilen kuduz karşı minimum koruyucu antikor titresini $\geq 0.5IU/ml$ 'dir Bu değer kuduz hastalığına karşı korunmada gereklidir.

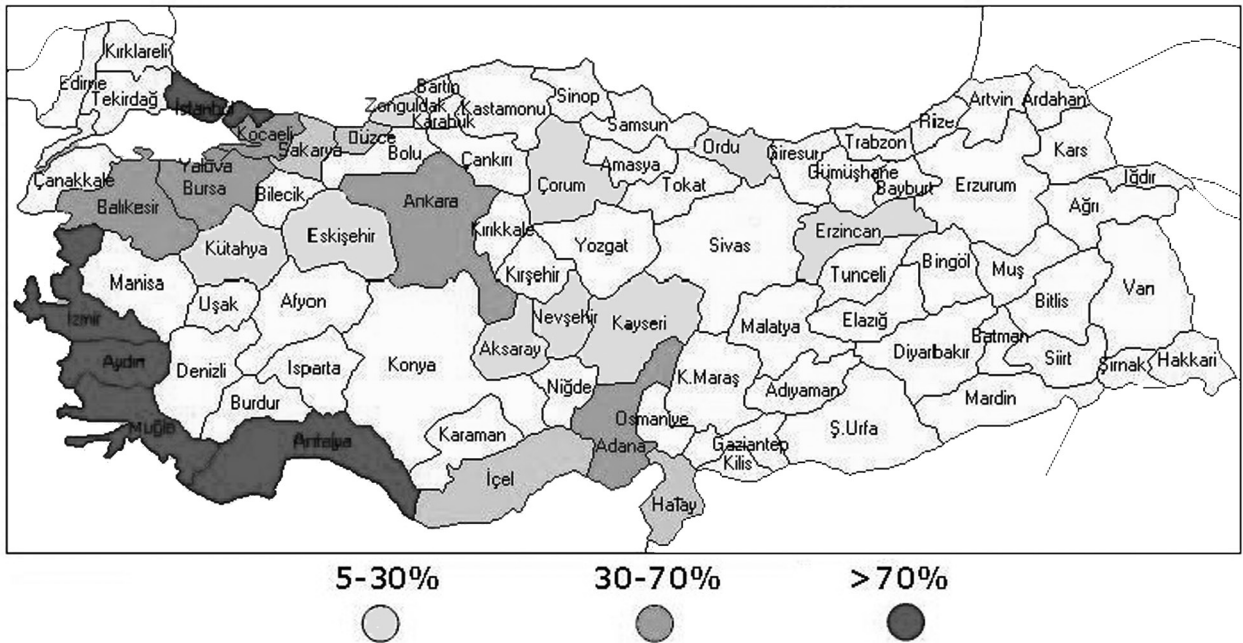
Köpek ve kedilerin dünya üzerinde seyahat edebilmeleri için aşılama ve yeterli anti kuduz antikor varlığının belgelendirilmesi zorunludur (17). Antikor varlığının belgelendirilmesi amacıyla serolojik tanı yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemler insan ve hayvan kuduz aşılarının oluşturduğu bağışık yanıtın kantitatif tayini ve de-

ğerlendirilmesi için geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en çok kullanılanları Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ve Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Testtir (FAVN) (4,13,15,16,19). FAVN, serumdaki Kuduz virusu antikorlarının saptanmasında en yaygın kullanılan yöntemdir.

Bu çalışmanın amacı; 2005-2010 yılları arasında VKMAE, Kuduz teşhis laboratuvarına gönderilen ve Kuduz aşıları ile aşılandıkları beyan edilmiş olan köpek ve kedilerin kan örneklerinin aşılama sonrası tesbit edilen ve koruyucu titrenin ($\geq 0.5IU/ml$) altında kalan antikor titreleri için spesifik risk faktörlerini belirlemek, antikor yanıtlarının sahipli ve/veya sokak hayvanı oluşu, yaş, cins ve yıllara göre bir değerlendirmesini ortaya koymaktır.

Materyal ve Metot

Serum numuneleri: Çalışma materyalini, 2005-2010 yılları arasında VKMAE, Kuduz Teşhis Laboratuvarına Türkiye'nin farklı 24 ilinden (soğuk zincir altında) kuduz antikor titre tayini için gönderilen toplam 8776 adet köpek ve kedi kan serum örnekleri oluşturmaktadır Serum örneklerinin gönderildiği iller numune sayılarına göre haritada, numunelerin yıllara göre dağılımları ise tabloda gösterilmiştir. (Şekil1, Tablo1)



Şekil 1. 2005-2010 yılları arasında VKMAE gönderilen serum örneklerinin illere göre dağılımı.

Tablo1. 2005-2010 yılları arasında VKMAE gönderilen serum örneklerinin sayısı ile tesbit edilen antikor titrelerinin tür ve yıllara göre dağılımı

YIL	Gelen Serum Sayısı	≥ 0.5 IU/ml		<0.5 IU/ml			
		n	%	n	%		
2010	köpek	1474	1907	1730	90.71	177	9.3
	kedi	433					
2009	köpek	1456	1864	1733	93	131	7.0
	kedi	408					
2008	köpek	1212	1615	1528	94.61	87	5.4
	kedi	403					
2007	köpek	1319	1837	1723	93.8	114	6.2
	kedi	518					
2006	köpek	1038	1449	1313	90.61	136	9.4
	kedi	411					
2005	köpek	90	104	99	95.2	5	4.8
	kedi	14					
Toplam	köpek	6589	8776	8126	92.6	650	7.4
	kedi	2187					

Hücre kültürü: CVS-11 (Challenge Virus Standard-11) suşunun üretilmesinde, VKMAE, Kuduz Teşhis Laboratuvarı stoklarında bulunan BHK-21 hücre kültürü kullanıldı. (BHK-BSR Clone 13: ATCC CCL-10), Hücre kültürü likit nitrojen tankında saklandı.

Kontrol Virus: BHK-21 hücre kültürüne adapte CVS-11 suşu (ATCC VR 959) kullanıldı. CVS-11 suşu VKMAE, Kuduz Teşhis Laboratuvarı stoklarından kullanıldı.

Reaktif ve Biyolojik Maddeler: Araştırmada, Tripsin % 0,25 (pH 7,8), Versene % 0,02 (pH 7,8), MEM-TW (pH 7,2-7,4), MEM-SNT (pH 7,2-7,4), PBS (pH 7,2-7,4), Newborn Calf Serum, Distile Su, Aseton %80'lik, Konjugat (FITC Anti Rabies

Globulin, Centocor), Referens Serum (OIE Referens köpek serumu) kullanıldı.

Kullanılan test yöntemi: FAVN test Cliquet F, ve ark. (4) tarafından bildirilen yöntemle göre modifiye edilerek kullanıldı, (SOP No:VKMAE.T.04. KDT.02). WHO Monografında ve OIE Manual'de belirtilen uyarılar dikkate alındı (16,19).

Değerlendirme: Floresan mikroskopta (Leicha ve Olympus) 10x büyütme ile 96 gözlü pleytler kontrol edildi, sonuçlar kaydedilerek Spearman-Kaerber metoduna (4) göre değerlendirildi.

Koruyucu titre: WHO ve OIE tarafından kabul edilen minimum değer 0.5IU/ml'dir (16,19). Bu değere eşit ve üzerinde tesbit edilen değerler, kuduz hastalığına karşı koruyucu antikor titresine sahip olarak değerlendirildi.

Bulgular

VKMAE, Kuduz Teşhis Laboratuvarında 2005-2010 yılları arasında toplam 8776 kan serum örneği kuduz antikorları yönünden incelenmiştir. Bu serumlar 24 farklı ilden soğuk zincir altında gönderilmiş ve 6589 adet köpek ve 2187 adet kedi serumundan oluşmuştur. Bunlardan 8126 adet serumda ≥ 0.5 IU/ml titrede kuduz virusuna karşı oluşmuş olan antikorların varlığı tesbit edilmiş, 650 adet serumda ise kuduz virusuna karşı oluşmuş olan antikorların varlığı <0.5 IU/ml titrede tesbit edilmiştir. Ayrıca 299 adet serum numunesinde ise 0.5IU/ml titresine eşit değer tesbit edilmiştir. Bulunan değerler yıllara göre tablolarda belirtilmiştir (Tablo 1,2,3). Köpek ve kedilerde 2005-2010 yılları arasında <0.5 IU/ml titrede antikor tesbit edilen örneklerin yıl ve yaşa göre sayı, oran ve cinsleri karşılaştırılmış, sonuçlar tablolar halinde verilmiştir (Tablo 4,5,6,7). Aynı örneklerin son aşılama tarihi ile kan alım tarihi arasında geçen süreler yıl ve örnek sayısına göre de değerlendirilmiştir (Tablo 8,9)

Tablo 2. Köpeklerde ≤ 0.5 IU/ml titrede antikor tesbit edilen örneklerin yıllara göre sayıları ve oranı

Köpek	0.5IU/ml		0.4IU/ml		0.3 IU/ ml		0.2 IU/ml		0.1 IU/ml		0.0 IU/ml		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2010	50	3.4	15	1	23	1.56	38	2.6	13	0.88	48	3.25	137	9.29
2009	42	2.8	2	0.14	20	1.37	29	2	24	1.65	36	2.47	111	7.62
2008	65	5.3	1	0.08	5	0.41	12	1	12	1	34	2.8	64	5.28
2007	41	3.1	2	0.15	7	0.53	26	1.9	5	0.38	41	3.1	81	6.14
2006	21	2	11	1.05	14	1.34	11	1.05	16	1.54	43	4.14	95	9.15
2005	2	2.2	1	1.1	-	-	-	-	-	-	3	3.3	4	4.4
Toplam	221	3.3	32	0.48	69	1.04	116	1.76	70	1.06	205	3.79	492	7.46

Tablo 3. Kedilerde ≤ 0.5 IU/ml titrede antikor tesbit edilen örneklerin yıllara göre sayıları ve oranı

Kedi	0.5 IU/ml		0.4IU/ml		0.3 IU/ ml		0.2 IU/ml		0.1 IU/ml		0.0 IU/ml		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2010	15	3.4	2	0.46	12	2.77	16	3.7	3	0.7	7	1.6	40	9.23
2009	23	5.6	-	-	2	0.49	8	1.96	8	1.96	2	0.49	20	4.9
2008	20	4.9	-	-	2	0.49	12	2.9	3	0.74	6	1.48	23	5.7
2007	15	2.9	3	0.58	7	1.35	13	2.5	1	0.19	9	1.73	33	6.37
2006	5	1.2	9	2.18	6	1.45	9	2.18	6	1.45	11	2.67	41	9.97
2005	-	-	-	-	1	7.14	-	-	-	-	-	-	1	7.14
Toplam	78	3.6	14	0.64	30	1.37	58	2.7	21	0.96	35	1.60	158	7.3

Tablo 4. Köpeklerde 2005-2010 yılları arasında titre <0.5 IU/ml olan örnek sayılarının yaş ve titreye göre karşılaştırılması

Köpek	0.4IU/ml					0.3IU/ml					0.2IU/ml					0.1IU/ml					0.0 IU/ml					Toplam					
	05	06	07	08	09	10	05	06	07	08	09	10	05	06	07	08	09	10	05	06	07	08	09	10	05		06	07	08	09	10
0-6 ay	1	3	-	-	1	7	-	5	5	2	2	5	-	3	12	2	13	9	-	4	3	5	10	5	1	12	16	12	12	14	164
7-12 ay	-	5	-	-	-	4	-	2	1	1	8	12	-	2	4	5	8	7	-	3	1	2	6	2	-	14	10	9	9	12	127
13-18 ay	-	-	1	-	1	2	-	3	-	1	9	-	-	4	7	3	6	7	-	5	1	3	2	3	-	9	6	8	11	9	101
19-24 ay	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	3	-	1	1	1	-	3	-	2	-	1	2	1	-	1	2	1	-	5	26
25-30 ay	-	2	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	1	17
31-36 ay	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	-	1	4	-	1	-	-	-	2	-	-	5	-	-	2	20
37-42 ay	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	2	-	9
43-48 ay	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	5
5-7 yaş	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	1	-	2	3	1	1	1	4	18
7-10 yaş	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	5
Toplam	1	11	2	1	2	15	-	14	7	5	20	23	-	11	26	12	29	38	-	16	5	12	24	13	3	43	41	34	36	48	

Tablo 5. Kedilerde 2005-2010 yılları arasında titre <0.5 IU/ml olan örnek sayılarının yaş ve titreye göre karşılaştırılması

Kedi	0.4IU/ml					0.3IU/ml					0.2IU/ml					0.1IU/ml					0.0 IU/ml					Toplam					
	05	06	07	08	09	10	05	06	07	08	09	10	05	06	07	08	09	10	05	06	07	08	09	10	05		06	07	08	09	10
0-6 ay	-	1	1	-	-	1	1	3	4	1	1	5	-	2	3	7	3	7	-	3	1	2	2	1	-	7	4	1	-	3	64
7-12 ay	-	2	1	-	-	1	-	1	1	-	1	3	-	3	5	2	-	3	-	1	-	1	2	-	-	3	3	1	1	3	38
13-18 ay	-	5	-	-	-	-	-	2	1	1	-	4	-	2	1	2	2	2	-	1	-	-	4	1	-	1	2	1	1	1	34
19-24 ay	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
25-30 ay	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
31-36 ay	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
37-42 ay	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
43-48 ay	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
5-7 yaş	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	3	-	-	7
Toplam	-	9	3	-	-	2	1	6	7	2	2	12	-	9	13	12	8	16	-	6	1	3	8	3	-	11	9	6	2	7	

Tablo 6. Yaş ve yıllara göre titre <0.5 IU/ml olan köpek ve kedi örneklerinin toplam sayısı ve oranlarının değerlendirilmesi

Yıllar	Köpek								Kedi								G.Toplam	
	10	09	08	07	06	05	n	%	10	09	08	07	06	05	n	%	n	%
0-6 ay	40	38	21	36	27	2	164	33.3	17	6	11	13	16	1	64	40.5	228	35.08
7-12ay	37	31	17	16	26	-	127	25.8	10	4	4	10	10	-	38	24	165	25.38
2 yaş	34	31	19	18	25	-	127	25.8	10	8	4	6	12	-	40	25.3	167	25.7
3 yaş	15	3	2	8	9	-	37	7.52	1	2	-	1	1	-	5	3.2	42	6.46
4 yaş	2	5	2	1	4	-	14	2.85	-	-	1	2	1	-	4	2.5	18	2.8
5 yaş	2	-	-	-	-	-	2	0.40	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0.3
7-11 yaş	7	3	3	2	4	2	21	4.3	2	-	3	1	1	-	7	4.4	28	4.3
Toplam	137	111	64	81	95	4	492	7.5	40	20	23	33	41	1	158	7.3	650	7.4

Tablo7. Köpek ve kedilerde kuduz antikor titresi <0.5 IU/ml olanların cinslere göre sayıları

	Köpek türleri										Kedi türleri						
	Melez	Terrier/ cocer	Boxer./Pitbul Rottweiler/ Doberman	Labrador	G.Shepher/ Kurt/ Husky	Setter/ Golden Retriever	Dalmaçyalı	Kangal	Melez	Tekir	Sarman	İran	Van	Ankara	Siyam		
2005	1	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-		
2006	51	17	7	4	5	9	1	1	15	10	7	2	2	5	-		
2007	29	18	7	2	10	3	8	4	13	7	4	4	1	-	4		
2008	27	12	7	2	9	4	2	1	6	3	1	4	5	1	3		
2009	46	17	10	4	12	14	6	2	6	5	3	1	2	3	-		
2010	41	23	18	7	19	16	7	6	16	7	9	2	1	4	1		

Tablo 8. Köpeklerde titresi <0.5 IU/ml olan örneklerin son aşılama ile Kan alım tarihi arasında geçen sürenin yıl ve örnek sayısına göre değerlendirilmesi

Köpeklerde aşılama- kan alım tarihi arasında geçen süre	2010		2009		2008		2007		2006		2005		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0-30 gün	34	24.8	38	34.2	20	31.3	25	30.9	25	26.3	1	25	143	29.1
31-60 gün	33	24.0	30	27.0	18	28.1	22	27.2	36	38	2	50	141	28.7
61-90 gün	30	21.9	18	16.2	11	2.23	21	26	21	22.1	-	-	101	20.5
91-120 gün	11	8.0	5	4.5	2	3.1	3	3.7	4	4.2	-	-	25	5.1
121-150 gün	6	4.4	2	1.8	3	4.7	2	2.5	3	3.2	-	-	16	3.3
151-180 gün	5	3.6	3	2.7	2	3.1	4	5	2	2.1	-	-	16	3.3
181-210 gün	18	13.1	15	13.5	8	12.5	4	5	4	4.2	1	25	50	10.2
Toplam	137	-	111	-	64	-	81	-	95	-	4	-	492	-

Tablo 9. Kedilerde titresi <0.5 IU/ml olan örneklerin son aşılama ile kan alım tarihi arasında geçen sürenin yıl ve örnek sayısına göre değerlendirilmesi

Kedilerde aşılama- kan alım tarihi arasında geçen süre	2010		2009		2008		2007		2006		2005		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0-30 gün	16	40	8	40	7	30.4	10	30.3	13	31.7	-	-	54	34.2
31-60 gün	13	32.5	8	40	9	39.1	13	39.3	15	36.6	-	-	58	36.7
61-90 gün	9	22.5	4	20	5	21.7	9	27.2	8	19.5	1	100	36	22.8
91-120 gün	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121-150 gün	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
151-180 gün	1	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.6
181-210 gün	1	2.5	-	-	2	8.7	1	3.0	5	12.2	-	-	9	5.7
Toplam	40	-	20	-	23	-	33	-	41	-	1	-	158	-

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada örneklenen hayvanlara ait bilgiler sahipleri tarafından doldurulan başvuru formlardan edinilmiştir. Bu form, türler hakkındaki detaylı bilgiyi içermesi nedeniyle, yaş, cinsiyet, ırk, doğum tarihi, çip numarası, kullanılan aşı adı, aşının seri no ve son kullanım tarihi, son aşılama ve kan örnekleme yapıma tarihi, aşılama geçmişi ve aşılama sırasında tıbbi tedaviler dahil, türler hakkında detaylı bilgiyi içermesi nedeniyle bir çok veriyi analiz etmede bize yardımcı olmuştur. Bu verilerin analizi ile 2005-2010 yılları arasında, Kuduz Teşhis Laboratuvarına kuduz antikor titre tayini için gönderilen köpek ve kedi kan serumlarının genel bir değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çalışmada Kuduz aşısı serolojik yanıt analizi için toplam 8776 adet köpek ve kedi kan serumu çalışılmış, 8126 (% 92.6) adet serum örneğinde serum antikor varlığı ≥ 0.5 IU / ml titre değerlerinde bulunurken 650 (% 7.4) adet serumda ise kuduz virusuna karşı oluşmuş olan antikorların varlığı 0.5 IU/ml titre değerinin altında kalmıştır. Çalışılan kan örneklerinin büyük bir kısmı sahipli köpek ve kedi kan serumlarından oluştuğu ve kuduz aşılamalarının her yıl düzenli takip edildiği göz önüne alındığında, %92.6 oranında çıkan ≥ 0.5 IU / ml antikor titresi beklenen değerde olmuştur. Antikor titresinin koruyucu titrenin altında kaldığı % 7.4 oranında serum örneklerinde, yeterli bağışıklığın oluşmadığı görülmüştür. Sonuçlar sahipli ve ve/veya sokak hayvanı oluşu, cins, yaş ve titre değerlerine göre incelendiğinde sahipli hayvan olmak, yaş ve tür

parametrelerinin antikor oluşumunda önemli etken olduğu ortaya çıkmıştır.

Yeterli bağışıklığın oluşmadığı, antikor titresinin 0.5 IU/ml titre değerinin altında kaldığı %7.46 köpek serum numunelerinde, bir yaşından daha küçük köpekler ile 6 yaş üzerindeki köpeklerde başarı oranının, 2 ile 5 yaş arasındaki köpeklere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Antikor titresinin 0.5 IU/ml titre değerinin altında kaldığı köpek serum numunelerinin % 33.3'ü 0-6 ay arası, % 26'sı 7-12 ay arası, % 26'sı 2 yaşa kadar olan köpeklerde, % 7.5'i 3 yaş, % 3'ü 4 yaş, % 0.4'ü 5 yaş ve, % 4.3'si ise 7-10 yaş arası köpeklerde tespit edilmiştir (Tablo 4,6).

Yine yeterli bağışıklığın oluşmadığı 0.5 IU/ml titre değerinin altında tesbit edilen % 7.3 olan kedi kan serumlarının % 40.5'i 0-6 ay yaşlarda, % 24.'ü 7-12 ay yaşlarda, % 25.3'ü 2 yaş, % 3.6'sı 3yaş, % 2.5'si 4 yaş, % 4'ü ise 7-10 yaş arası kedilerde tespit edilmiştir (Tablo 5,6). Mansfield ve ark'larının (14) çalışmalarında aşılanmış 6 aydan daha küçük ve 5 yaşından daha büyük köpeklerde 6 aylık ve 5 yaş arasındaki köpeklere göre daha yüksek bir başarısızlık oranı saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, Mansfield ve ark.(14) bulgularını teyit etmektedir. Yine Kennedy ve ark'da (11) köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada yetişkinlere göre, artan yaşın ve bunun yanında bir yıldan daha küçük yaşlardaki köpekler için de; düşük antikor titrelerinin, daha yüksek bir risk gösterdiğini saptamışlardır. Büyük köpeklerde daha düşük antikor titrelerinin artan yaş ile birlikte bağışıklık sisteminde düşük bir verimlilik nedeniyle olabileceği, ancak bu düşük verimlilik

ğin antikor yanıtı etkileyecek düzeyde olmayacağını belirtmişlerdir (1,6,7,9). Genç köpeklerde var olan maternal antikorların erken aşılama sonrasında düşük antikor titrelere için yüksek risk oluşturmasına bağlı olabileceğini vurgulamışlardır (1,5,6,10,11). Bu çalışmada elde edilen bilgiler de bu durumu destekler niteliktedir.

Kennedy ve ark. (12) tarafından yapılan çalışma sonuçlarında 10.483 (VLA) adet köpekte belirledikleri kuduz titrelerinde bir yaşından küçük, genç hayvanların, kuduz aşısının yetişkinlerden daha düşük bir antikor yanıt oluşturduğu gösterilmiştir. Çalışmamız da elde ettiğimiz sonuçlarda, bir yaş altındaki köpek ve kedilerde sırasıyla %56 ve %64 oranlarında 0.5 IU/ml değerinden daha düşük titre tesbit edilmesi de bunu desteklemiştir.

Antikor titresinin, 0.5 IU/ml titre değerinin altında kaldığı; köpeklerde %7.46 kedilerde % 7.3 olan kan örneklerini, son aşılama tarihinden kan alım tarihine kadar geçen süreleri antikor titrelere göre değerlendirdiğimizde, köpek kan serumlarında 0-90 gün arasında geçen sürelerde ortalama % 26.1, 91-150 gün arasında geçen sürelerde ortalama % 4 ve 151-210 gün arasında geçen sürelerde ise % 6.75 oranında yeterli bağışıklığın oluşmadığı tesbit edilmiştir. Kedilerde ise 0-60 gün arasında geçen sürelerde ortalama % 35.5, 61-90 gün sonrasında geçen sürelerde ortalama % 22.8, 91-150 gün arasında geçen sürelerde ortalama % 0.0 ve 151-210 gün arasında geçen sürelerde % 5.7 oranında yeterli bağışıklığın oluşmadığı tesbit edilmiştir. Berndtsson ve ark.(1) köpeklerde son aşılama tarihi ile kan alım tarihi arasında geçen süreleri değerlendirdikleri çalışmalarında, aşılama sonrası 120-150 gün arasında geçen süre ile 151-180 arasında geçen sürede örnekledikleri köpeklerden daha yüksek antikor titrelere ulaştıklarını belirtmişler. Yine Jakel ve ark. (10) köpeklerden aşılama 4 ay sonrasında alınan kan örneklerinde, daha sonra alınan örneklerle göre antikor yanıtın koruyucu titreye ulaşma zamanının anlamlı derecede daha yüksek şansa sahip olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada elde edilen bilgiler de bu bulguları destekler niteliktedir (Tablo 8,9).

Kennedy ve ark. (11) tarafından yapılan istatistiksel analizlerle farklı köpek ırkları için her aşının etkinliği değerlendirilmiştir. Hayvan büyüklüğü, yaş, cins, serum örnekleme zamanı ve aşının, titrelere üzerinde önemli etkileri olduğu tesbit edilmiştir. Hayvan boyutu ve antikor yanıt seviyesi arasında

genel bir ilişki olduğu, küçük boyutlu köpek ırklarında büyük köpek ırklarından daha yüksek antikor düzeyleri gösterdiği ifade edilmiştir. Ancak aşılama takiben antikor titre değerinin ve bağışıklık süresinin köpek ırkları arasında değişmediği gözlenmiştir (1,11). Jakel ve ark.da (10) yaptıkları çalışmada da köpek ve kedilerde aşılama takiben ırk ve cinsiyetin antikor titre değerini ve bağışıklık süresini etkilemediği gözlenmiştir.

Mansfield ve ark (14) kedi ve köpeklerin kuduz aşısı serolojik yanıtı etkileyen faktörler üzerinde yaptıkları çalışmada, antikor titresinin 0,5IU/ml değerine ulaşamamasının aşı, aşılama ve örnekleme, cinsiyet ve yaş, hayvan ve menşe ülke arasındaki ilişkiden etkilendiğini göstermişlerdir. Özellikle köpeklerde, tüm bu faktörlerin, cinsiyet hariç, test başarısızlık oranında, son derece önemli etkileri olduğunu, kedilerde ise tüm faktörlerin önemli bir etkisinin olduğunu yaptıkları çalışmada ortaya koymuşlardır (1,10,11,14.).

Yavru köpek ve kediler, eğer anneleri kuduz karşı bağışık ise yaşamlarının ilk saatleri içinde kolostrom yoluyla pasif bağışıklıkla koruma almaktadırlar. Bu şekilde maternal antikor alan yavrulara yaşamlarının ilk 16 haftası içinde yapılan rutin aşılama bağışıklık sisteminde önemli değişikliğe sebep olmaktadır. Böylece erken aşılama sonrası, yeni doğan tarafından kazanılmış pasif immünglobulinlerle oluşturulan endojen bir immün yanıt tarafından koruyucu bir bağışıklığın oluşması baskılanmaktadır (1,6,7). Bu durum özellikle 6 aylıktan küçük köpek ve kedilerde aşıların bağışıklık vermemesinin en önemli nedenidir.

Uygun bir aşılama olmasına rağmen, görülen düşük antikor titresinin sebepleri; yukarıda da belirtildiği gibi anneden gelen maternal antikorların ilk dört ay içinde yapılan aşıları baskılaması, örnekleme zamanında geçirilen viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların immün sistemi baskılaması sonucu antikorun eşik değere ulaşmadaki süresini uzattığı, birçok çalışmada ifade edilmiştir (1,6,7,10,11,14)

Türkiye genelinde 5 yıllık bir süreç içinde yaptığımız toplam 8776 köpek ve kedi kan serumunun 8126 (% 92.6) örneğinde serum antikor varlığının 0.5 IU/ ml titresine eşit veya yüksek bulunması önemlidir. Örneklerin tamamına yakınının sahipli hayvanlardan oluştuğu ayrıca bir yaşından büyük hayvanların çoğunluğunda birden fazla kuduz aşısının yapılmış olması yüksek titre değerini açıklar.

maktadır. Yine yaptığımız çalışmada antikor titresinin değerinde, ırk ve cinsiyet etkisinin önemsiz olduğu görülmektedir. Genç köpeklerin, ilk aşılamadan sonra, titrelerinde 0,5 IU/ml 'nin altında sonuçların alınması hastalık bulaşma açısından yüksek bir risk içermektedir. Bunu önleme aşamasında üretici tavsiyelerine göre en az 21 gün sonra ikinci bir aşı ve sonrasında tekrar kan örnekleme yapılmasıyla bu risk minimize edilebilir. Rapel aşı uygulaması özellikle büyük köpek ırkları için tavsiye edilmektedir (1).

Sonuç olarak bu veriler dikkate alınarak pet hayvanları ile birlikte seyahat planı yapan kişiler için ayrıca aşılama sonrası başarı düzeyini belirlemek isteyen hayvan sahipleri için bazı çıkarımlarda bulunulabilir. Test tekrarlarından kaçınmak isteyen hayvan sahipleri öncelikle kimlik ve kayıtları zamanında ve doğru olarak yapmalıdırlar. Bu her şeyden önce kuduz hastalığından korunmak için yapılmalıdır. Özellikle Türkiye gibi hastalığın endemik olarak seyrettiği ülkeler için bir zorunluluktur. Öncelikli hedef koruyucu titreye sahip pet hayvanlarına sahip olmak olmalıdır.

Uluslararası seyahat planı yapan hayvan sahipleri için koruyucu titre değeri bir ön koşul olarak son yıllarda ortaya çıkmıştır. Özellikle Avrupa Birliği bu hususa çok dikkat etmektedir (17). Pet hayvanlarında koruyucu titreye ulaşmasında en etkili başlıca parametreler; hayvanın yaşı, boyutu, ilk aşılama yaşı ve zamanı, kullanılan aşı suşu, üretici firma, uygulanan aşı sayısı, aşılama sonrası kan örnekleme zamanı, aşılama anında hayvanın normal fizyolojik ve metabolik durumda olmasıdır. Hayvan sahipleri başarılı bir seyahat planı yapmak istiyorlarsa bu parametrelere dikkat etmelidirler. Bu dikkat hem ekonomik hem de zaman kaybı açısından avantaj sağlayacaktır. Bu riskler göz önünde bulundurularak yapılan başarılı bir serolojik örnekleme koruyucu titre tesbitinde en önemli aşamadır.

Kaynaklar

- Berndtsson TL, Nyman JAK, Rivera, E, Klingeborn B, (2011). *Factors associated with the success of rabies vaccination of dogs in Sweden*. Acta Vet Scand, 53, 1, 22.
- Buxton A, Fraser G, (1977). *Rhabdoviruses in Animal microbiology*. Blackwell Scientific Publication, Edinburg, pp. 553-576.
- CDC, (2011). *Rabies*. Erişim adresi : <http://www.cdc.gov/rabies/index.html>. Erişim tarihi:10.01.2012.
- Cliquet F, Aubert MFA, Sagné L, (1998). *Development of a fluorescent antibody virus neutralizing test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody*. J Immunol Meth.,212,79-87.
- Cliquet F, Verdier Y, Sagné L, Aubert M, Schereffer JL, Selve M, Wasniewski M, Servat A, (2003). *Neutralising antibody titration in 25,000 sera of dogs and cats vaccinated against rabies in France, in the framework of the new regulations that offer an alternative to quarantine*. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 22, 857-866.
- Day MJ, (2007). *Immune system development in the dog and cat*. J Comp Path. 137, 10-15.
- Day MJ, (2010). *Ageing immunosenescence and inflammation in the dog and cat*. J Comp Path. 142, 60-69.
- Gillespie JH, Timoney JF, (1981). *Hagan and Bruneer's infectious diseases of domestic animals*. Seventh edition. Cornell University Press. p. 785-781.
- Hogenesch H, Thompson S, (2010). *Effect of ageing on the immune response of dogs to vaccines*. J Comp Path.142,74-77.
- Jakel V, König M, Cussler K, Hanschmann K, Thiel HJ, (2008). *Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies*. Dev Biol. 131, 431-436.
- Kennedy LJ, Lunt M, Barnes A, McElhinney L, Fooks AR, Baxter DN, Ollier WER, (2007). *Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies*. Vaccine. 25, 8500-8507.
- King AA, Turner GS, (1993). *Rabies: a review* J Comp Path.180, 1-39.
- Louie RE, Dobkin MB, Meyer P, Chin B, Roby RE, Hammar AH, Cabasso VS, (1975). *Measurement of rabies antibody comparison of the Mouse Neutralization Test (MNT) with the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)*. J Biol Stand. 3,365-373.
- Mansfield KL, Burr PD, Snodgrass DR, Sayers R, Fooks AR, (2004). *Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination*. Vet Rec. 154, 423-426.
- Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, (1996). *The fluorescent antibody test*. Fourth edition. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. eds. Laboratory techniques in rabies WHO. Geneva. p.88-93
- OIE, (2009). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals rabies*. Erişim adresi: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.01.13_RABIES. Erişim Tarih: 09.01.2012.
- Regulation (EC), (2003). *No. 998/2003 of the European Parliament and of the Council of 26 May 2003 on the animal health requirements applicable to the non-commercial movement of pet animals and amending Council Directive 92/65/EEC*.
- Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü sağlık istatistik yıllıkları, (2006). *Çalışma yıllıkları*. Erişim adresi: <http://www.sb.gov.tr/TR/belge/1-5250/temel-saglik-hizmetleri-genel-mudurlugucalisma-yilligi.html>. Erişim tarihi: 09.01.2012.
- WHO, (2005). *World Health Organization expert consultation on rabies*. WHO Tech Rep Ser 931, Geneva.
- Yousaf MZ, Qasim M, Zia S, Khan M R, Ashfaq AU, Khan S, (2012). *Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment*. Virol J. 9, 50. Erişim adresi: <http://www.virologyj.com/content/9/1/50>.

Almanya’da fertilitate problemlili ineklerde endometriyal svabların bakteriyolojik bulguları ve antibiyotik dirençliliği*

Gülşen GONCAGÜL¹, Kamil SEYREK İNTAŞ², Reinhard WEİSS³, Ellen PRENGER-BERNINGHOFF³, Rainer HOSPES⁴, Axel WEHREND⁴

¹Uludağ Üniversitesi Mennan Pasinli Meslek Yüksekokulu, Görükle Kampüsü, Bursa-Türkiye

²Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Görükle Kampüsü, Bursa-Türkiye

³Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig- Universität Frankfurter Strasse 85-89, 35392 Gießen-Almanya

⁴Klinik für Geburtshilfe Gynäkologie und Andrologie der Gross- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz Justus-Liebig- Universität Frankfurter Strasse 106, 35392 Gießen-Almanya

Geliş Tarihi / Received: 11.05.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 18.06.2012

Özet: Infertilite sığır yetiştiriciliğinde en büyük ekonomik kayıplara yol açan ilk iki problemden biridir. İneklerde infertilitenin önde gelen sebeplerden birisi endometritistir. Endometritislerin büyük bir bölümünü bakteriyel enfeksiyon etkenleri oluşturur. Bu çalışmada repeat breeder ineklerden toplanan 142 adet endometriyal svab mikrobiyal ve antibiyotik duyarlılığı yönünden değerlendirildi. Yüz kırk (%98,5) numune bakteriyolojik yönden pozitif bulundu. Bunların %22,1’i *Escherichia coli*, %15,3’ü α -hemolitik Streptococci, %14,3’ü γ -hemolitik Streptococci, %12,1’i *Trueperella* (Eskiden *Arcanobacterium*) *pyogenes*, %4,2’si *Streptococcus uberis*, %3,6’ü *Staphylococcus aureus*, %0,7’si *Staphylococcus haemolyticus*, %0,7’si β -hemolitik Streptococci, geri kalan %27,0’i ise 16 farklı bakteri izolasyonlarıdır. İneklerde fertilitateyi en sık etkileyen bakteriler olarak *Trueperella. pyogenes*, *E.coli*, β - hemolitik *Streptococci*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus haemolyticus* etkenlerine karşı antibiyogram testi uygulandı. Pozitif numunelerde üreyen bakterilerde, penisilin, tularotromisin, tetrasiklin, eritromisin, florfenikol, seftiofur, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, enrofloksasin, gentamisin, sefkuinom, kolistin, marbofloksasin, sulfametoksazol/trimetoprim olmak üzere 14 antibiyotiğe karşı duyarlılığı test edilmiştir. *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, β -hemolitik *Streptococci*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*’a florfenikol ve seftiofur’un %100 etki ettiği saptanırken, *Escherichia coli* hariç diğerlerinin kolistin’e %100 dirençli olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, infertil ineklerde endometriyal svablarında yüksek oranda bakteriyel etkenlerin üretilmiş olması nedeniyle infertilite ile mücadelede ilk sıranın bakteri kaynaklı endometriyal enfeksiyonlara karşı verilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Florfenikol ve seftiofur’un uterus enfeksiyonlarının sağaltımında en geniş spektruma sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Bakteri, endometritis, inek.

Bacteriological findings and antibiotic resistance in endometrial swabs of cows with fertility problems in Germany

Summary: Infertility is one of the most important problems causing great economical losses in cattle production. The most important reason for infertility in cows is endometritis. Endometritis is mainly caused by bacterial infections. Bacteria in uterine samples obtained from 142 repeat breeder cows were cultured and investigated for their antimicrobial susceptibility. One hundred forty samples (98.5%) were bacteriologically positive. Out of these 22.1% were *Escherichia coli*, 15.3% α -hemolytic *Streptococci*, 14.3% γ -hemolytic *Streptococci*, 12.1% *Trueperella* (formerly *Arcanobacterium*) *pyogenes*, 4.2% *Streptococcus uberis*, 3.6% *Staphylococcus aureus*, 0.7% *Staphylococcus haemolyticus* and β -hemolytic *Streptococci* each, and the remaining 27% were 16 different bacterial isolates. *Trueperella pyogenes*, *E.coli*, β -hemolytic *Streptococci*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* were considered to be the most frequently encountered bacteria causing infertility. Antimicrobial susceptibility tests were performed in these bacteria against 14 antibiotics (Penicillin, tularthromycine, tetracycline, erythromycin, florfenicol, ceftiofur, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, enrofloxacin, gentamycine, cefquinom, colistin, marbofloxacin, sulphamethoxazole/trimethoprim). *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, β -hemolytic *Streptococci*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* were 100% susceptible to florfenicol and ceftiofur. All other bacteria except for *Escherichia coli* and *Staphylococcus haemolyticus* were 100% resistant against colistin. As a conclusion, the presence of such a high occurrence of bacteria in uterine samples of infertile cows shows that bacterial infections have to be given priority in the struggle against infertility. Florfenicol and ceftiofur are found to be drugs with the widest spectrum in the treatment of uterine infections.

Key words: Bacteria, endometritis, cow.

Giriş

Uterus enfeksiyonları ineklerin en önemli reproduktif hastalığıdır. Uterus enfeksiyonları, ineklerin üreme performanslarını ve genel sağlık durumlarını olumsuz yönde etkiler. Endometritis çoğunlukla, ineklerde doğum esnasında ve doğumdan sonra, açık olan serviksten başta bakteriler olmak üzere diğer mikroorganizmaların uterus lumenine invazyonuyla ortaya çıkmaktadır (1). Klinik enfeksiyonlarda endometritis olgusu, vaginal mukus makroskopik olarak incelenmesi ile saptanır. Bakteriyolojik olarak *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Trueperella pyogenes* (*T.pyogenes*) gibi patojen bakterilerin varlığına göre teşhis edilir (22). Özellikle süt üretimi yapan işletmelerde meydana gelen endometritis (8,10,11,17) büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Birçok inekte normal östrus siklusuyla ve/veya doğumu takip eden 4-6 hafta süre içerisinde uterus içerisindeki patojen bakteriler defans mekanizmasıyla uzaklaştırılır. Ancak ineklerin yaklaşık %20 gibi bir oranında, uterus içi patojenleri temizlemede başarısız olması nedeniyle uterusunda şiddetli doku hasarı, infertilite gibi kronik uterus enfeksiyonları ve hatta ölüm bile görülebilmektedir. Bu durum dünya çapında 2.5 milyar € maddi kayba neden olmaktadır (15). Endometritis bakterisi, virus ve mantar gibi mikroorganizmaların neden olduğu belli şartlar oluştuğunda ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalık olması nedeniyle tanısı, eradikasyonu ve sağaltımı oldukça zor bir hastalıktır. Süt sığırlarında endometritisin, daha çok bakteriyel ajanlardan kaynaklandığı saptanmıştır (9).

İneklerin buzağılamasını takiben ilk 2 hafta boyunca, *E.coli* gibi Gram negatif anaerob bakterileri birçok ineğin uterusundan izole etmek mümkündür (19). Ancak çoğu inekte kendiliğinden bakteriler elimine edilir (15). Nitel ve nicel uterus bakteriyel kontaminasyonu ineğin savunma mekanizması ve bakteriyel kontaminasyonu arasındaki dengeye bağlıdır (21). İneklerde buzağılamayı takiben ilk 10 gün içerisinde spesifik olmayan, özellikle *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., ve *Bacillus* spp., puerperal endometritis olmadan uterusundan izole edilebilir. En sık endometritise neden olan uterus patojenleri *E.coli* ve *T.pyogenes*'dir (14,23). *E.coli* özellikle erken postpartum dönemde en yaygın görülür, farklı dönemlerdeki enfeksiyonlarda da her zaman diğer patojenlerden daha fazla izole edilir (6,23). *E.coli* birçok bakteri ile sinerjik

etki göstererek uterus enfeksiyonlarının şiddetini arttırmaktadır. İneklerde genital mukozanın geniş olması nedeniyle her noktasından svabla numune alınmaması ve/veya rutin muayenelerde her defasında numunenin alınmaması nedeniyle fark edilmeyen enfeksiyon başlangıçları nedeniyle bakteriler uterus içerisinde sayıca artarak endometrit meydana getirebilmektedir (19). Günümüzde ineklerde endometritisin sağaltımında sistemik ve/veya rahim içi antibiyotikler kullanılmaktadır (3). Yaygın antibiyotik kullanıma rağmen patojen endometritis ajanı olarak bilinen *Trueperella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* ve *Klebsiella* spp., miks olarak kültürlerde izole edilebilmektedir (3). Şu anda kullanılan antibiyotiklerin patojenlere karşı etkinliği azalmıştır. Endometritis görülen sürülerde veteriner hekimin, tekrarlayan ve uzun süreli antibiyotik kullanması sonucu, süt ve ette antibiyotik kalıntısına ve patojenlerde direncin gelişmesine neden olabildiği bildirilmiştir. Endometritiste yüksek veteriner faturaları, inek itlaf ve/veya ölümü, azalan fertilité, vücut kondisyonunda azalma ve hayvan refahının düşmesi ile oluşan maddi kayıp oldukça yüksektir. Ayrıca antibiyotik kullanımı ile ürün kalitesinin düşmesi ve kontrolden kaçan durumlarda halk sağlığı üzerinde olumsuz etkileri söz konusudur (4). İneklerde endometritisin farklı coğrafi bölgeler arasında prevalans ve farklılıkları yeterli düzeyde araştırılmamıştır. Bu çalışmada, Almanya'nın Hessen eyaletindeki ineklerde uterusundan alınan numunelerde bulunan bakteriler ve bunların antibiyotiklere karşı gösterdikleri duyarlılık araştırıldı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 18.01.2006-28.09.2008 tarihleri arasında Justus-Liebig-Universitesi Veteriner Hijyen ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Justus-Liebig-Universität) Diagnostik Bakteriyoloji Laboratuvarına infertilite nedeniyle muayenesi yapılan 142 inekten alınmış bakteriyel endometrium numuneleri kullanıldı. Alınmış numunelerin bakteriyolojik identifikasyonları yapıldı ve antibakteriyel duyarlılıkları tespit edildi. Numune alınacak ineklerde kontaminasyonu engellemek için dış genital bölgede vulva dudakları ve rima vulva antiseptik emdirilmiş kağıt havlularla birkaç defa temizlenip dezenfekte edildi. Sonra aralanan vulva dudakları arasından vaginaya yerleştirilmesini takiben dispo-

sible uterus svabı veya bu amaçla geliştirdiğimiz Seyrek-İntaş katateri yardımı ile bakteri kontaminasyonuna dikkat edilerek, rektovaginal yolla örnek alındı. Alınan örnekler Stuart's Transport Medium (Oxoid) içerisinde en kısa zamanda cam ya da plastik ağzı kapalı tüplerde, 4-6°C'de laboratuara ulaştırıldı.

Numunelerin işlenmesi: Teşhis laboratuvarına getirilmiş örnekler geleneksel bakteriyolojik yöntemler yardımıyla her biri kanlı agara (Merck 10886, %10 defibrine koyun kanı), Gassner-Agara (Merck 1282) ve serum buyyona geçilerek direkt kültürleri yapıldı. Ekimi yapılan plaklar 37°C derecede 24 saat aerobik ve %10 CO₂'li etüvde inkübe edildi. 24 saat sonrasında üreme görülmeyen kültürler 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. 1-4 koloniye kadarki üremeler (önemsiz), 5-50 koloniye kadar olan üremeler (+), 50-200 koloniye kadarki üremeler (++), 200 koloninin üzerindeki üremeler +++ (kuvvetli), şeklinde değerlendirildi. Toplam 48 saat sonrasında ayırımında şüphe duyulan kolonilerin subkültürleri yapıldı. Mikroorganizmaların standart laboratuvar metodlarından biyokimyasal testler ve API sistemi (BioMérieux, Milan-Italy) yönergesine göre identifikasyonları yapıldı.

Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, penisilin (10 IU), tultatromisin (30 µg), tetrasiklin (30µg), eritromisin (30µg), florfenikol (15µg), seftiofur (30µg), amoksisilin/klavulanik asit (30µg), amoksisilin (25 µg), enrofloksasin (5µg), gentamisin (10µg), sefkuinom (30µg), kolistin (50 µg), marbofloksasin (10µg), sulfametoksazol/trimetoprim 1:19 (25µg) olmak üzere 14 antibiyotik diski kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle antibiyogram testi yapıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri her bir bakteri için, Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine 0.5 McFarland düzeyinde bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra ilgili 14 antibiyotik diski 2 petri kabına paylaştırılarak disk difüzyon yöntemiyle yapıldı (18).

Bulgular

Alınan 142 adet numunenin 140 adedi (%98,5) bakteriyolojik kontrollerinde pozitif bulundu. 2 adet numuneden izolasyon yapılamadı. 101 adet (%72.1) numuneden birden fazla bakteri tipi izole edildi. Miks kültürlerde *T.pyogenes*, *E.coli*, hemoliz yapan *E.coli*, koliform grubu, *Staphylococcus aureus*

(*S.aureus*), α-hemolitik *Streptococci*, β-hemolitik *Streptococci*, ve basil birlikte çoğunlukla izole edildi. Tablo 1'de bu çalışmada izole edilen bakteriler ve sıklığı verilmektedir.

Tablo 1. İneklerde uterustan izole edilen bakteriler ve izolasyon oranı

Bakteriler	İzolasyon sayısı	İzolasyon oranı (%)
<i>Trueperella pyogenes</i>	34	12,1
<i>Escherichia coli</i>	62	22,1
<i>Streptococcus uberis</i>	12	4,3
β-hemolitik <i>Streptococci</i>	2	0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	3,7
<i>Escherichia coli</i> hemolitik	4	1,4
<i>Moraxella (Branhamella)</i>	2	0,7
Koliform bakteri	4	1,4
γ-hemolitik <i>Streptococci</i>	40	14,3
α-hemolitik <i>Streptococci</i>	42	15,0
<i>Bacillus</i> spp	24	8,6
<i>Proteus</i> spp.	6	2,1
<i>Corynebacterium</i> spp.	10	3,7
<i>Morganella morganii</i>	2	0,7
<i>Pasteurella multocida</i>	4	1,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	1,4
<i>Clostridium perfringens</i>	2	0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0,7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	0,7
<i>Enterococcus</i> spp.	4	1,4
<i>Erwinia</i> spp.	2	0,7
<i>Micrococcus</i> spp.	2	0,7
<i>Klebsiella</i> spp.	2	0,7
Toplam	280	100,0

En çok izole edilen bakteriler *E.coli*, hemoliz yapan *E.coli*, koliform grubu (70 izolat, %25,0) bunu takiben α-hemolitik *Streptococci* (42 izolat, %15,0), β-hemolitik *Streptococci* (40 izolat, %14,3), *T. pyogenes* (34 izolat, %12,1), *Streptococcus uberis* (*S.uberis*) (12 izolat, %4,3), *S.aureus* (10 izolat, %3,6), *Corynebacterium* (10 izolat, %3,6)

Staphylococcus haemolyticus (*S.haemolyticus*) (2 izolat, %0,7)'dir.

Bakteri izolatlarının antimikrobiyal ilaçlara duyarlılığı disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelendi (18). *Trueperella pyogenes* için test edilen 14 antibiyotikten kolistine karşı göze çarpan bir direnç (%100) saptandı (Tablo 2). Yüksek duyarlılık ise (%100), penisilin, tularromisin, florfenikol, seftiofur, amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin ve sefkuinoma karşı gözlenmiştir. İzole edilen 62 adet *E.coli* izolatı sırasıyla %85,7 ve %57,1 oranında penisilin ve tetrasikline dirençli bulundu. Diğer antibiyotik duyarlılığı kontrol edilen 12 antibiyotiğe karşı %100 duyarlı olduğu belirlendi. β -hemolitik *Streptococci* için test edilen 14 antibiyotikten, tetrasiklin, gentamisin ve kolistine karşı göze çarpan bir direnç (%100) saptandı. *S.aureus*'a karşı en etkin

antibiyotik (%100) eritromisin, florfenikol, seftiofur, enrofloksasin marbofloksasin ve sulfametoksazol/trimetoprim olduğu belirlendi. *S.haemolyticus* izolatlarının hepsi yüksek ve aynı tarzda 11 antibiyotiğe karşı (tularromisin, tetrasiklin, eritromisin, florfenikol, seftiofur, amoksisilin/klavulanik asit, enrofloksasin, sefkuinom, kolistin, marbofloksasin, sulfametoksazol/trimetoprim) %100 duyarlı, 2 antibiyotiğe (amoksisilin, gentamisin) orta dercede duyarlı bulunurken, penisilin karşı ise %100 dirençli bulundu. (Tablo2). 12 adet *S.uberis* izolatlarında kolistine karşı %100 direnç gözlenirken penisilin, florfenikol, seftiofur, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, enrofloksasin, sefkuinom, sulfametoksazol/trimetoprim %100 duyarlılık saptandı (Tablo2).

Tablo 2. İneklerden İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılığı (%)

Bakteriler		P	TUL	TE	E	FF	EFT	AMC	AML	ENO	GM	CEQ	CO	MAR	SXT
<i>Trueperella pyogenes</i>	S ^ψ	100	100	50	80	100	100	100	100	80	80	100	-	90	80
	I [¥]	-	-	40	10	-	-	-	-	10	10	-	-	10	10
	R ^θ	-	-	10	10	-	-	-	-	10	10	-	100	-	10
<i>Escherichia coli</i>	S	-	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	I	14.3	-	42.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	85.7	-	57.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -hemolitik <i>Streptococci</i>	S	100	100	-	100	100	100	100	100	100	-	100	-	100	100
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	100	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	-	-	-	100	100	100	-	-	100	100	-	-	100	100
	I	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	R	100	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	S	-	100	100	100	100	100	100	-	100	-	100	100	100	100
	I	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-	-
	R	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	S	100	80	40	60	100	100	100	100	100	-	100	-	80	100
	I	-	-	-	40	-	-	-	-	-	20	-	-	20	-
	R	-	20	60	-	-	-	-	-	-	80	-	100	-	-

ψ: Sensitive P: Penicilline E: Eritromisin AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit, GM: Gentamisin, ¥: Intermediate, TUL: Tularromisin, FF: Florfenikol, AML: Amoksisilin, CEQ: Sefkuinom, θ: Resistant, TE: Tetrasiklin, EFT: Seftiofur, ENO: Enrofloksasin, CO: Colistin, MAR: Marbofloksasin, SXT: Sulfametoksazol/Trimetoprim

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmaya dahil edilen ineklerin uterusundan alınan ve bakteriyolojik olarak pozitif (%98,5) bulunan numunelerin %36,2'si potansiyel uterus patojeni olarak belirlenmiştir. Avusturya'da yapılan çalışmada ise 261 servikal svabtan %58,2 oranında bakteriyel pozitiflik saptanırken, potansiyel patojen bakteri oranının %28,7 olduğu bildirilmiştir (19). Çalışmamızda izole edilen bakteri türleri daha önce yapılmış olan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (9, 26, 27). Bizim çalışmamızda en yaygın izole edilen uterus patojeni *E.coli* ve *T.pyogenes* sırasıyla %22,1, %12,1 oranında izole edilmiştir. Yapılan diğer farklı çalışmalarda da bizim çalışmamızdaki gibi, en yaygın uterustan izole edilen *E.coli* ile *T.pyogenes*'tir. (9, 13, 28). Genital sistemin en patojen bakterisi *T.pyogenes* (13, 15), çalışmamızda %12,1 oranında izole edilmiştir. Santos ve ark. (20) sütçü ineklerde post partum dönemde uterustan izole edilen *T.pyogenes*'in virulans geni fimA ile metritis varlığını ortaya koymuşlardır. İneklerde endometritiste en fazla izole edilen etken olan *E.coli*'nin lipopolisakkarit yapıda bir endotoksin üretmesine karşın, *T.pyogenes*'in uterus dokusunda daha ciddi lezyonlar meydana getirerek, infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (23). Goncagül ve ark. (12), pneumovajinalı ineklerde meydana gelen endometritiste dominant etken olarak enteral kaynaklı *E.coli*'yi izole etmişlerdir. Köpeklerde ve kadınlarda yapılan benzer çalışmalarda da en sık izole edilen etken *E.coli* olmuştur. Araştırmacılar *E.coli* etkeninin endometritiste dominant etken olarak izole edilmesini, etkenin sahip olduğu pap, sfa, hlyA, cnF1 ve fim gibi üropatojenik virulans faktörlerinin (UVF) urogenital sistem mukozasına tutunmasıyla enfeksiyon meydana getirmesine bağlı olduğunu açıklamaktadırlar (2, 5). *S.aureus*'un patojen bir etken olarak ineklerin fertilitesine olumsuz etkileri abortus meydana getirmesi bildirilmektedir (19, 21). Petit ve ark. (19) sütçü ineklerde *S.haemolyticus* çalışmamızda olduğu gibi %0,7 oranında izole etmişlerdir.

Antimikrobiyal direncin küresel tehdidi özellikle son 12 yıl içerisinde önemi gittikçe anlaşıldı. Özellikle antibiyotiklerin hayvancılık ve tarımda büyüme hızlandırıcı ve proflaktik amaçla kullanımının bu direncin gelişmesinde etkisi olabileceği düşünülmektedir (25).

E.coli özellikle ineklerde puerperal dönemde görülen metritisten sorumlu etken olarak en fazla

izole edilmektedir (21). Bu çalışmada da %22,1 oranında *E.coli* saptandı. Yapılan antibiyotik duyarlılığına göre etkene florfenikol, seftiofur, amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin ve sefkuinom'un %100 etki gösterdiği, ancak izolatların kolistine %76,9 oranında direnç gösterdiği belirlendi. Çalışmamızda hemolitik *E.coli* %1,2 oranında izole edildi. Etken için yapılan antibiyogram testinde, tulatromisin, eritromisin, florfenikol, seftiofur, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, enrofloksasin, gentamisin, sefkuinom, kolistin, marbofloksasin, sulfametoksazol/trimetoprim'e %100 etki ettiği saptandı.

Malinowski ve ark. (16) yaptıkları antibiyotik duyarlılık çalışmasında aynı etkenin bizim çalışmamızdaki oran kadar olmasa da, amoksisilin, gentamisin, marbofloksasine %80,7 ile %95,8 oranında duyarlı olduğu belirlenmiştir. Diğer araştırmacıların yaptığı çalışmalarda *E.coli*'nin kloramfenikol, enrofloksasin, gentamisin sefkuinom ve seftiofur'a değişen oranlarda duyarlı olduğunun belirlemişlerdir (7, 21, 24).

Çalışmamızda *T.pyogenes*'e uygulanan antibiyotik duyarlılık testine göre, penisilin, tulatromisin, florfenikol, seftiofur, amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin ve sefkuinoma karşı duyarlılık (%100) aksine kolistine karşı ise %100 gibi yüksek oranda dirençlilik saptanmıştır. Santos ve ark. (20), sütçü ineklerde yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamızda elde edilen sonuçların aksine, *T.pyogenes*'in amoksisilin, penisilin ve florfenikole direnç belirlemişlerdir. Bölgesel olarak bakteri izolasyon oranları ve antibiyotik dirençliliği farklılık göstermektedir. Bu durumda, ideal olarak uterus enfeksiyonlarının sıkı takip edilmesi gerektiği ve patojen bakterilerin izolasyonunu takiben, antibiyotik duyarlılık çalışmalarının rutin yapılmasının özellikle tedavi başarısını oldukça etkileyebileceği kanaatini uyandırmaktadır.

Sonuç olarak elde edilen bulgulara göre, ineklerde uterus inflamasyonlarına neden olan etkenler düzenli ve sürekli monitoring çalışmaları ile izlenmeli ve saptanan pozitif kültürlerle uygulanacak antibiyotik duyarlılık testleri ile çiftlik hayvanlarında saptanan bakteri direncinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Böylece herhangi bir enfeksiyonda yapılacak kör tedavi için kullanılacak antibiyotığın doğru seçimi, tedavi başarısını arttıracak gibi, ekonomik kayıpların ve ileride antibiyotiğe karşı gelişebilecek direncin önüne geçilmesini sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Amiridis GS, Fthenakis GC, Dafopoulos J, Papanikolaou T, Mavrogianni VS, (2003). *Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis*. J Vet Pharmacol Therap. 26, 387-390.
2. Arora N, (2007). *Role of uropathogenic virulence factors in the pathogenesis of E.coli-induced cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch*. PhD thesis, University of Melbourne, Australia.
3. Azawi OL, (2008). *Postpartum uterine infection in cattle*. Anim Reprod Sci. 105, 187-208.
4. Chapwanya A, (2008). *Uterine disease in dairy cows: Classification, diagnosis and key roles for veterinarians*. Irish Vet J. 61 (3), 183-186.
5. Chen YM, Wright PJ, Lee CS, Browning GF, (2003). *Uropathogenic virulence factors in isolates of Escherichia coli from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches*. Vet Microbiol. 94, 57-69.
6. Dohmen MJW, Joop K, Sturk A, Bols PEJ, Lohuis JACM, (2000). *Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta*. Theriogenology. 54, 1019-1032.
7. Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzner P, Nattermann H, Heuwieser W, (2001). *Evaluation of systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows*. J Dairy Sci. 84, 2010-2017.
8. Esslemont RJ, Peeler EJ, (1993). *The scope for raising margins in dairy herds by improving fertility and health*. Brit Vet J. 149, 537-547.
9. Foldi J, Kulcsar M, Pecsai A, Huyghe B, Sa de C, Lohuis J A, Cox P, Huszenicza GY, (2006). *Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle*. Anim Reprod Sci. 96, 265-281.
10. Gautam G, Nakao T, Yusuf M, Koike K, (2009). *Prevalence of endometritis during the post-partum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds*. Anim Reprod Sci. 116 (3-4), 175-187.11.
11. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M, (2005). *Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows*. Theriogenology. 64, 1879-1888.
12. Goncagül G, Seyrek-Intas K, Kumru IH, Ozakin C, Weiss R, Prenger-Berninghoff E, Baljer G, (2011). *Bacterial infertility and ascending uterine infections with respect to pneumovagina and urovagina in cows*. Veterinary Days of Uludag University - Bursa and Justus Liebig University - Giessen; July, 14-16, Giessen-Germany.
13. Huszenicza G, Fodor M, Gacs M, Kulcsar M, Dohmen MJW, Vamos M, Porkolab L, Kegl T, Bartyik J, (1999). *Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds*. Reprod Dom Anim. 34, 237-245.
14. Königsson K, Gustafsson H, Gunnarsson A, Kindahl H, (2001). *Clinical and bacteriological aspects on the use of oxytetracycline and flunixin in primiparous cows with induced retained placenta and post-partal endometritis*. Reprod Dom Anim. 36, 247-256.
15. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton S, Johnson WH, (2002). *Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows*. J. Dairy Sci. 85, 2223-2236.
16. Malinowski E, Lassa H, Markiewicz H, Kaptur M, Nadolny M, Niewitecki W, Zietara J, (2011). *Sensitivity to antibiotics of Arcanobacterium pyogenes and Escherichia coli from the uteri of cows with metritis/endometritis*. Vet J. 187 (2), 234-238.
17. Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald LF, Donovan GA, (2004). *Uterine involution and fertility of holstein cows subsequent to early postpartum PGF2alpha treatment for acute puerperal metritis*. J. Dairy Sci. 87 (10), 3238-3246.
18. NCCLS (2005). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, approved Standard M100-S15*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
19. Petit T, Spersger J, Rosengarten R, Aurich J, (2009). *Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle*. Reprod Dom Anim. 44, 88-91.
20. Santos TMA, Caixeta LS, Machado VS, Rauf AK, Gilbert RO, Bicalho RC, (2010). *Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in Arcanobacterium pyogenes isolated from the uterus of postpartum dairy cows*. Vet Microbiol. 145, 84-89.
21. Sheldon IM, Dobson H, (2004). *Postpartum uterine health in cattle*. Anim Reprod Sci. 82 / 83, 295-306.
22. Sheldon IM, Williams EJ, Miller ANA, Nash DM, Herath S, (2008). *Uterine diseases in cattle after parturition*. Vet J. 176, 115-121.
23. Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE, (2009). *Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle*. Reprod Dom Anim. 44, 1-9.
24. Silva N, Lobato FC, (1998). *Isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria recovered from uteri of dairy cows with post-partum endometritis*. Rev Bras Reprod Anim. 23, 410-411.
25. Tollefson L, Miller MA, (2000). *Antibiotic use in food animals: Controlling the human health impact*. J AOAC Int. 83, 245- 254.
26. Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W, (2010). *A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows*. Theriogenology. 74, 1248-1255.
27. Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM, (2005). *Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle*. Theriogenology. 63, 102-117.
28. Zerbe H, Ossadnik C, Leibold W, Schuberth HJ, (2001). *Influence of Escherichia coli and Arcanobacterium pyogenes isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils*. Vet Microbiol. 79, 351-65.

Bir kuzuda giardiosis olgusu

Akın KIRBAŞ¹, İbrahim BALKAYA², Ahmet TEMUR³

¹Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum

²Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum

³Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner Kontrol Enstitüsü, Erzurum

Geliş Tarihi / Received: 07.11.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 08.05.2012

Özet: Bu olguda bir kuzuda belirlenen giardiosis enfeksiyonunun klinik, parazitolojik ve patolojik bulgularının bildirilmesi amaçlandı. Olgunun materyalini 1 aylık, dişi, morkaraman bir kuzu oluşturdu. Olgunun klinik muayenesinde, yapışkan karakterde, yağlı, mukuslu ve kötü kokulu bir ishal ile tenesmus, dehidrasyon, depresyon ve koordinasyon bozukluğu tespit edildi. Olgunun nekropsisinde yağlı ve mukuslu dışkı ile zayıflama belirlendi. Olgudan elde edilen dışkı örneğinin natif ve flotasyon yöntemi ile yapılan muayenesinde, *Giardia* spp. trofozoitleri saptandı. Bağırsakların histopatolojik kesitlerinde, villuslarda kütleşme, villusların lamina propriasında lenfosit ve eozinofil infiltrasyonları tespit edildi. Sonuç olarak, neonatal dönemdeki kuzularda görülen ishal olgularında giardiosis göz önünde bulundurulması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: Giardiosis, kuzu, klinik semptom, patoloji, parazitoloji.

A giardiosis case in a lamb

Summary: The aim of this report was to determine the clinical, parasitological and pathological findings of giardiasis case in a lamb. The material was a female, one month old lamb in morkaraman breed. The clinical examinations showed that, there are mucoid diarrhea in bad smelled, fatty and sticky nature; additionally tenesmus, dehydration, depression and coordination disorder. In necropsy, fatty and mucoid feces along with weight loss were determined. During native and examinations using flotation method, *Giardia* spp. trophozoites were found. Additionally, in histopathological sections of the intestines, villi flattening as well as presence of lymphocytic and eosinophilic infiltrates were detected in the lamina propria. As a result, giardiosis should be considered in diarrhoeic lambs during neonatal period.

Key words: Giardiasis, lamb, clinical signs, pathology, parasitology.

Giriş

Giardiosis, *Giardia* soyuna ait flagelluma sahip protozoonların neden olduğu bir bağırsak hastalığıdır. *Giardia duodenalis* evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak gözlenen önemli intestinal parazitlerdendir (10). *G. duodenalis* enfeksiyonuna çoğu memeli türünde ve insanlarda rastlanmakta (5), özellikle buzağı (3, 18), oğlak (7) ve kuzularda (1, 9, 11, 15, 17) yaygın olarak görülmekte, ara sıra da sığır, koyun, keçi (5, 10), tay (17) ve lama (6)'larda da gözlenmektedir.

Giardiosisün dünya genelinde doğal enfeksiyonlar şeklinde yaygın olarak gözleendiği belirtilmiştir (1, 6, 7, 11). Türkiye'de de kuzularda *G. duodenalis*'e bağılı enfeksiyonlar bildirilmiştir (14, 15). Bunlara ilaveten, Arslan ve ark.'nın (2), 2008 yılında yaptıkları retrospektif bir çalışma-

da, 2002-2007 yılları arasında Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne gönderilen numunelerin paraziter hastalıklar yönünden değerlendirilmesi neticesinde Erzurum ve Erzincan illerinden gelen birer koyun örneğinde giardiosisün tespit edildiği belirtilmiştir.

Ozmen ve ark. (12), 2006 yılında kuzu ve oğlaklarda yaptıkları bir çalışmada dışkı örneklerinde *Giardia intestinalis* tespit etmişler ve bu sonuçları histopatolojik olarak da teyit etmişlerdir.

Doğumdan kısa bir süre sonra ruminantların *Giardia* türlerine maruz kalmalarına rağmen enfeksiyonların daha çok neonatal dönemin sonuna doğru görüldüğü belirtilmektedir (10).

Kuzularda klinik olarak dehidrasyon, depresyon, tenesmus, abdominal şişkinlik, kötü kokulu ishal, hipotermi ve ilerleyen dönemde ölüm tablosunun gelişebileceği bildirilmiştir (1, 7, 15).

Klinik olarak *G.duodenalis* enfeksiyonunun belirlenemediği durumlarda, parazitolojik muayeneler ve sürü bazında meydana gelen ölümlerde histopatolojik muayenelerin eşliğinde teşhis kesinleştirilmektedir (15).

Parazitolojik muayenelerde, dışkının natif pe-raparat muayenesinde hareketli *Giardia* spp. trofozitlerinin görülebileceği ifade edilmektedir (13, 15). Ayrıca moleküler yöntemler kullanılarak da etkenin tespit edilebileceği bildirilmektedir (4). Patolojik muayenede, sulu kıvamda kahve renkli ishal, mukus ve bağırsaklarda yoğun gaz oluşumu en sık gözlenen bulgular olarak belirtilmektedir (15). Bağırsakların histolojik kesitlerinde villuslarda kütleşme, villusların lamina propriasında eozinofil, lenfosit ve plazma hücrelerinin belirlenebildiği ve hafiften şiddetliye kadar değişen infiltratif enteritisin geliştiği bildirilmektedir (1, 7). *Giardia* trofozitlerinin epitel hücrelerin mikrovilluslarına yapıştığı ve çoğunlukla villuslar arasındaki kısımlarda lokalize oldukları, nadiren de Lieberkühn kriptlerinde bulunduğu belirtilmektedir (8). *Giardia*'lar konkav yüzeyleri epitel hücrelerin fırçası kenarlarına yapışık olarak yarım ay şeklinde görülürler (8, 15).

Bu olgu sunumunda bir kuzuda belirlenen giardiosis enfeksiyonunda klinik, parazitolojik ve patolojik bulguların bildirilmesi amaçlanmıştır.

Olgunun Tanımı

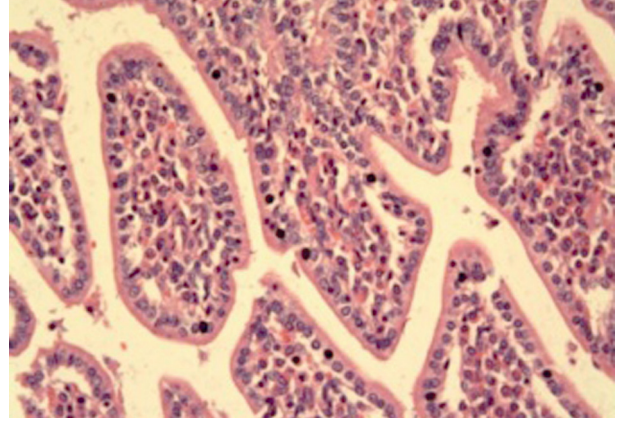
Olgunun materyalini, Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne teşhis amacıyla getirilen canlı, 1 aylık dişi morkaraman bir kuzu oluşturdu.

Klinik muayenede, beyaz renkli, yapışkan, mukuslu, yağlı ve kötü kokulu bir ishal, tenesmus, dehidrasyon ve depresyon ile koordinasyon bozukluğu tespit edildi. Parazitolojik muayene için, dışkı örneği alındı. Alınan dışkı örneği natif preparat ve çinko sülfat flotasyon yöntemleri ile muayene edildi (13).

Patolojik muayene için kuzunun nekropsisi yapıldı. Histopatolojik inceleme için; bağırsaktan alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit içinde tespit edildi. Tespit edilen dokular rutin doku takibinden sonra parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin eosin (HE) boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi (16).

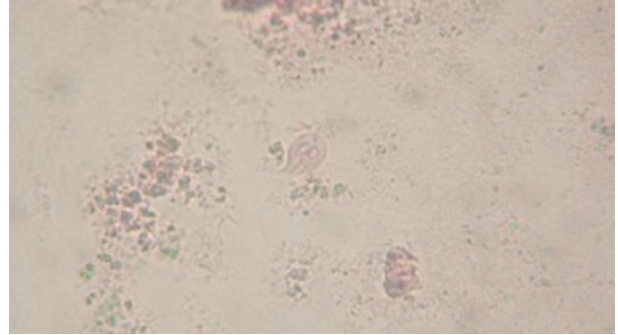
Bulgular

Olgunun makroskobik incelemesinde, yumuşak, yağlı, mukoid kıvamda dışkı ile belirgin zayıf bir karkas görünümünde olduğu tespit edildi. Olgunun histopatolojik incelemesinde, villuslarda kütleşme, lamina propriada lenfosit, eozinofil infiltrasyonu görüldü ve plazma hücreleri belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Bağırsakta lenfosit, eozinofil infiltrasyonu ve plazma hücreleri (Orijinal büyütme: X400, HE).

Olgudan elde edilen dışkının parazitolojik muayenesinde hareketli *Giardia* spp. trofozitleri belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Dışkıda natif bakıda *Giardia* spp. trofozoit formu (Orijinal büyütme: X400).

Tartışma ve Sonuç

Giardiosis enfeksiyonunda klinik tablonun; etkenin çevresel faktörlere direncine, enfeksiyöz dozuna, hayvanın yaşına ve bakım koşullarına bağlı olarak değişebileceği belirtilmektedir (17). Kuzularda *Giardia* ile ilişkili ishal olgularının genelde 2 ile 4 haftalık dönemde daha yaygın olarak görülmesine rağmen belirgin bir yaş sınırlamasının olmadığı ifade edilmektedir (9). Sunulan olgusunda benzer yaş aralığında olması bu durumu destekler niteliktedir.

Giardiosis olgularında ishalin, villus atrofi ve kript hiperplazisinden dolayı malabsorbtif karakterde olduğu, genellikle geçici ve aralıklı seyir izlediği belirtilmektedir (9, 17). Enfekte hayvanların klinik olarak normal görüldüklerinde bile kist çıkarmaya devam edebilecekleri bildirilmektedir (9, 10, 17). Bundan dolayı, yaşlı hayvanlarda dışkıda etkenin görülmesi, bu tür hayvanların diğer hayvanlar ve muhtemelen insanlar için enfeksiyon kaynağı olabileceğini göstermektedir (10, 17).

Özmen ve Yukarı (15), neonatal enteritisten ölen 12 kuzuda, en dikkati çeken semptomların; dehidrasyon, depresyon, tenesmus ve abdominal şişkinlik olduğunu söylemektedirler. Araştırmacılar (1, 9, 11, 17), giardiosisli kuzularda şiddetli kilo kaybı, büyüme geriliği, depresyon, yumuşak ve mukuslu bir ishalin gözleendiğini ve bu ishalin aralıklı ve kronik karakterde olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca *Giardia* türlerinin pankreatik lipaz aktivitesini engelleyerek yağ emiliminde bozulmaya, bununla birlikte ince bağırsaklarda aşırı bakteriyel üremeye ve safra tuzlarının dekonjugasyonuna ve bunların sonucunda da yağlı dışkılamaya yol açtığı bildirilmektedir (8). Sunulan olguda, literatürle uyumlu şekilde klinik olarak yağlı ve mukuslu, beyaz renkli bir ishalin varlığı tespit edildi.

Özmen ve Yukarı (15), giardial enteritli kuzuların barsak bölümlerinin histolojik kesitlerinde, lamina propria eozinofil, lenfosit ve plazma hücreleri gibi mononükleer ve polinükleer lökositlerin yoğun bir şekilde gözlenebileceğini bildirmektedirler. Koudela ve Vitovec (7), deneysel olarak enfekte ettikleri oğlakların duodenum ve proksimal jejunumlarında çok şiddetli lezyonlar ve orta derecede villöz atrofi, villuslarda kütleleşme, kript hiperplazisi ve lamina propria yangısal infiltrasyonların olduğunu bildirmişlerdir. Bunun devamında da infiltratif karakterde bir enteritis tablosunun oluştuğu belirtilmektedir (1, 7, 15). Bu olguda da bağırsağın histolojik kesitlerinde mikroskopik olarak, villuslarda kütleleşme, lamina propria tabakasında yoğun olarak lenfosit ve eozinofil infiltrasyonları ile plazma hücreleri görüldü.

Giardia duodenalis ile enfekte kuzuların dışkılarının parazitolojik muayenesinde Giemsa veya iyot ile boyanmış preparatlarda *Giardia* türlerinin trofozoit ve kistlerinin görülmesi ile tanıya gidildiği belirtilmektedir (13). Mevcut olguda, dışkı örneğinden natif ve flotasyon metodları ile hazırlanan pre-

paratlar mikroskopik olarak incelendi ve *Giardia* spp. trofozoitleri tespit edildi.

Arslan ve ark. (2), 2008 yılında yaptıkları retrospektif bir çalışmada, Erzurum ve Erzincan illerinden gelen birer koyun örneğinde giardiosis tespit edildiğini belirtmişlerdir. Sonraki yıllarda aynı araştırma enstitüsüne gönderilen bir kuzuda klinik semptomlar eşliğinde giardiosisin teşhis edilmesi bölgede nadiren de olsa enfeksiyonun varlığını göstermektedir.

Sonuç olarak, doğumdan sonraki 1-1.5 aylık kuzularda oluşan ishal olgularında giardiosis enfeksiyonunun da göz önünde bulundurulması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Caccio SM, Pozio E, (2006). Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet Parasitol.* 142, 154-158.
2. Arslan MÖ, Kara M, Temur A, Altun SK, Küçükalek ÖF, (2008). Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi çiftlik hayvanlarında parazitler hastalıklarının değerlendirilmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 14, 31-35.
3. Björkman C, Svensson C, Christensson B, Verdier K, (2003). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet Scand.* 44, 145-152.
4. Caccio SM, Ryan U, (2008). *Molecular epidemiology of giardiasis.* *Mol Biochemical Parasitol.* 160, 75-80.
5. Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E, (2010). Is *Giardia* a significant pathogen in production animals. *Exp Parasitol.* 124, 98-106.
6. Kiorpes, AL, Kirkpatrick CE, Bowman DD, (1987). Isolation *Giardia* from a lama and from sheep. *Can J Vet Res.* 51, 277-280.
7. Koudela B, Vitovec J, (1998). *Experimental giardiasis in goat kids.* *Vet Parasitol.* 74, 9-18.
8. Milli Ü, Hazroğlu R. (1997). *Veteriner Patoloji, Cilt-1.* Tamer Matbaacılık, Ankara.
9. Navarre CB, Pough DG, (2002). *Diseases of Gastrointestinal system.* Pough DG. eds. *Sheep and Goat Medicine.* Saunders, Elsevier. p. 69-105.
10. O'Handley RM, Olson ME, (2006). *Giardiasis and Cryptosporidiosis.* *Vet Clin Food Anim Pract.* 22, 623-643.
11. Olson ME, McAllister TA, Desellier L, Mork DW, Cheng KJ, Buret AG, Ceri H, (1995). Effect of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res.* 56, 1470-1474.
12. Özmen O, Yukarı BA, Haligur M, Sahiduran S, (2006). Observations and immunohistochemical detection of *Coronavirus*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal diarrhoea in lambs and kids. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 148, 357-364.
13. Özbek Y, Dağcı H, (1997). *Giardiosis'in laboratuvar tanısı.* Özcel MA, Üner A. eds. *Giardiosis.* Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No 14, İzmir. p. 79-115.
14. Özdal N, Tanrıtanır P, Göz Y, Değer S, Kozat S, (2009). Parasitic protozoans (*Eimeria*, *Giardia* and *Cryptosporidium*) in lambs with diarrhoea in the Van Province (Turkey). *Bull Vet Inst Pulawy.* 53, 47-51.
15. Özmen Ö, Yukarı BA, (2011). Kuzu giardiosisinde patolojik ve parazitolojik bulgular. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 4-10 Eylül, Kars. p. 205.
16. Presnell J, Schreiman MP, (1997). *Animal Tissue Techniques.* Fifth edition. The Johns Hopkins University Press. Ltd, London, p. 269-271.
17. Radostits OM, Gay CG, Hinchcliff KW, Constable PD, (2007). *Veterinary Medicine.* Tenth edition. Saunders, Elsevier, London, New York, p. 1515-1517.
18. Ruest N, Couture Y, Faubert GM, Girard C, (1997). Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Vet Parasitol.* 69, 177-186.

***Salmonella* klasik virulans faktörleri ve patojenite adaları (11, 12, 13, 14, 15, 16, SGA-1, YPA)**

Elçin GÜNAYDIN, Selahattin ŞEN

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

Geliş Tarihi / Received: 27.01.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 18.05.2012

Özet: *Salmonella* genusunun yol açtığı enfeksiyonlar konağın yapılanmasına ve suşun virulensine bağlı olarak hafif enfeksiyondan şiddetli enfeksiyona kadar geniş bir dağılım gösterir. *Salmonella* suşunun virulansı, virulans faktörleri diye adlandırılan, yapılarca belirlenir. Günümüze kadar çok sayıda virulans faktörü tespit edilse de, bilinen virulans faktörleri virulans-plazmidleri, toksinler, serum dirençliliği, sideroforlar, adhezinler, invazınlar diye adlandırılan klasik virulans faktörleri ve patojenite adaları olarak özetlenebilir.

Anahtar Sözcükler: *Salmonella*, klasik virulans faktörleri, patojenite adaları.

***Salmonella* classical virulence factors and pathogenicity islands (11, 12, 13, 14, 15, 16, SGI-1, HPA)**

Summary: Infections which are leaded by *Salmonella* genus show large range from mild to serious infection depending on the constitution of the host and virulence of the strain. The virulence of the strain is determined by so-called virulence factors. Till now, although many virulence factors were determined, well-known virulence factors are summarized as classical virulence factors termed such as virulence plasmids, toxins, serum resistance, siderophores, adhesions, invasions and pathogenicity islands.

Key words: *Salmonella*, classical virulence factors, pathogenicity islands.

Giriş

Salmonellaların yol açtığı hastalıklar, hastalık yapan suşun virulansına ve konağın konstruksiyonuna göre hafif enfeksiyondan şiddetli enfeksiyona değişiklik gösterir. Bakterinin konak bariyerlerini ega le edişi ve yeni konağa adaptasyon sağlayışı, hem hastalıkların orijinini ve hem de yeni patojenlerin ortaya çıkışını anlamının en doğru yoludur. Farklı *Salmonella* serovarları tarafından kullanılan virulans faktörlerinin analizi, konağa adaptasyon mekanizması çalışılması için güçlü bir model olarak hizmet verir. Çünkü bu patojenler fiziksel olarak iyi tanımlanmış ve aynı zamanda genetik analizlerin yapılmasına yatkındırlar. Salmonellaların konak dağılımları ve konağa adaptasyon dereceleri ise çeşitlilik arz eder. *Salmonella enterica* soyunun, şu an kullanılan nomenklatürde kabul edildiği üzere alt tür olarak geçen birçok farklı filogenetik bransa ayrıldığı varsayılmaktadır. *Salmonella enterica* subspecies I, geniş konak dağılımı gösterirken, *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica* subs-

pecies II, IIIa, IIIb, IV, VI ve VII temelde soğuk kanlı hayvanlarla ilişkilidir. *Salmonella enterica* subspecies I, memeli ve avian (kanatlı) türlerinin hastalık etkenidir. *Salmonella enterica* subspecies I serotiplerinin memeli ve avian (kanatlı) türlerinde karşı karşıya kaldıkları bariyerler soğuk kanlı vertebralılara göre daha kompleks yapı göstermektedir (1). Örneğin, soğuk kanlı hayvanların lamina propriasında lenf nodülleri tek başına bulunurken (2), memeli ve avian türlerinin barsak ilişkili lenf nodülleri, Peyer plakları, tonsiller veya avian türlerinde bursa Fabricius gibi kompleks organlar şeklinde organize olmuşlardır (3, 4). İlaveten, avian ve memelilerde somatik hipermutasyon sonrasında oluşan B-lenfosit varyantları, antijenlere affiniteyi arttırmak için lenfoid organların germinal merkezlerinde bulunmaktadır. Buna karşın, soğuk-kanlı vertebralıların lenfoid organlarında B hücrelerinin germinal merkezlerinde seleksiyon engellendiğinden, immun cevap esnasında antikor affinitesi artmaz (5, 6). Dahası, sürüngenler ve balıklar gibi dü-

şük vertebralıların antikor repertuarı memelilerden oldukça farklılık gösterir (7).

Yüksek vertebralıların germinal merkezlerinde bulunan B hücreleri izotip değişimi gösterir ve anı hücrelerine dönüşürler. Soğuk-kanlı vertebralılarda ise anı hücreleri yoktur (7) ve aynı etkene tekrar maruz kaldıklarında, sadece IgM antikorları şekillenmesi (2), bir patojenle infeksiyon sırasında izotip değişiminin meydana gelmediğini göstermektedir. Balıklarda intestinal mukozaya penetrasyon kabiliyetine sahip olan patojenler, dalağın sinozidlerinde lokalize olan fagositler tarafından kandan filtre olana kadar, vücudun sentral bölgelerine kontrol edilmeden saçılırlar. Kara vertebralıları, hayata adaptasyon esnasında lokal fitre sistemi vazifesi gören periferik lenfoid organlar geliştirmişlerdir (8). Bazı sürüngenlerde, az-gelişmiş lenf-nodülü benzeri yapılar rapor edilmesine rağmen (2), gerçek lenf nodülleri sadece memelilerde ve bazı kuş türlerinde bulunmaktadır (6, 9).

Memelilerde, oldukça efektif lenf filtre sistemi oluşturan çok sayıda lenf nodülü periferalde lokalize olmuştur (9). Böylece memelilerin intestinal mukozasına penetre olan *Salmonella* serovarları için, bölgesel lenf nodüllerinin lenfatik sinuslarında bulunan makrofajlar, saçılımı önünü kesmek için oldukça efektif bariyerlerdir. Memelilerde konak defans mekanizması; barsağa, barsak-ilişkili lenfoid dokuya ve mezenterik lenf nodüllerine bakteriyel saçılımı başarıyla engellemektedir. Bundan dolayı, sıcak-kanlı konakçılarda, bölgesel lenf nodüllerinin makrofajları tarafından oluşturulan lokal defansın *Salmonella* tarafından egale edilmesi gereklidir. *Salmonella enterica* subspecies I serotipleri, çoğunlukla sıcak kanlı hayvanların iç organlarında kolonize olabilmeye, hayatta kalabilme, retikuloendotelial sistem hücrelerinde çoğalabilme kabiliyetine, dolayısıyla; konaklarında sistemik infeksiyon oluşturabilme yetisine sahiptirler (10, 11).

Birbirinden uzak haemotermik hayvan türlerinin makrofajlarının, özellikle bir *Salmonella enterica* serotipini nötralize etme kabiliyetleri farklılık gösterdiği için, yeni konağa adaptasyon, konağın mononükleer fagositlerine adaptasyonu gerektirmektedir. Örneğin, insan-adapte *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi (*Salmonella* Typhi) invitro şartlarda insan makrofajlarında yaşarken, murin makrofajlarında hayatta kalamaz. Ya da, farelerde sistemik infeksiyonlara yol açan,

Salmonella Typhimurium murin makrofajlarında hayatta kalabilirken, insan makrofajlarında yaşayamaz (12). Tüm bu bariyerler akla şu soruyu getirmektedir. Memeliler ve kanatlılar bu kadar iyi savunma mekanizmasına sahipken, nasıl oluyor da *Salmonella* serovarları konak bariyerlerini geçip infeksiyon başlatma ve hastalık yapabilme kabiliyetine erişiyorlar? Bu sorunun cevabı evrimsel süreç boyunca gerek bakterinin kendisinde mevcut olan ve/veya horizontal gen transferi sonucunda kazandığı virulans faktörleri yardımıyla, bakterinin konağı kendi çıkarları için kullanabilmesi ve bu amaç için bünyesinde mevcut olan ve/veya geliştirdiği mekanizmalarla başarılabilmektedir.

Bu derlemede, *Salmonella*ların adhezyon-invazyon-hücre içi yaşam kabiliyetlerinde etkin olan faktörler, virulans plazmidleri, sideroforlar, toksinler, serum dirençliliği ve patojenite adaları gibi virulans faktörlerine ve bunların patogeneze katkısına değinilecektir.

Adhezyon-invazyon-hücre içi yaşam kabiliyeti: *Salmonella*ların intestinal epitel hücrelere yapışmaları (adhezyon), konağa adaptasyonları ve konağın hücreleri içine invaze olmaları infeksiyonun başlangıcı için yeterlidir. Konağa adaptasyonda nonfimbrial adhezinler görev alır. Sığırlarda nonfimbrial adhezinleri invH kodlar. invH'nin adhezyonda görevli olduğu, mutantlarla yapılan çalışmalarla ortaya konmuş ve mutant *Salmonella* serovarlarında konağa adaptasyon ve invazyonun kabiliyetlerinin azaldığı bildirilmiştir. *Salmonella* Patojenite Adası-1 (SPA-1)'de kodlanan, Tip III Sekresyon Sistemi (Type Three Secretion System; TTSS) 'nin bir parçası olan 2 gen; invA ve invE invazyonda görevlidir (13). Bu genlerdeki mutasyon, *Salmonella enterica* serovarlarının invazyon özelliğini etkiler fakat epitelyum hücrelerine adhezyonunu etkilemez. SPA-1 ile ilişkili adhezyon ve invazyon birbirinden bağımsız olaylardır. Kanatlılarda ise, konağın tanınmasında, *Salmonella enterica* içerisinde bulunan çeşitli fimbrial operonlar, alternatif adhezyon faktörlerinin olası adaylarıdır. Plasmid tarafından kodlanan fimbria (Plasmid encoded fimbria; pef) ve uzun polar fimbria (Long polar fimbria; lpf) tarafından kodlanan adhezinler *Salmonella* Typhimurium'un sırasıyla küçük barsak villuslarına ve peyer plaklarına yapışmasını sağlar. Ayrıca horizontal gen transferi ile kazanılan diğer fimbrial gen; sef kolonizasyonda önemlidir (13). Yani adhezin hangi konakta hangi

dokuya yapışacağını, bir başka ifadeyle konak dağılımını belirler. Adhezinler adhezin resptörüne bağlanırlar ve resptörler konakçı aralığını belirleyen bir diğer faktördür. Adhezyon için bakterinin metabolik olarak aktif olmasına gereksinim duyulmamasına rağmen, konakçı hücreye adhezyon sonrası invazyonu takiben canlı Salmonellaların protein sentezlemesi gereklidir (14, 15). Salmonellaların tamamen virulansı ilk aşamada, mukozaya invaze olmalarına bağlıdır (16). Adhezyon ve invazyon yetisi kültür ortamlarındaki üreme koşullarından etkilenir. Hücre kültürlerindeki logatritmik üreme fazındaki Salmonellalar, durağan fazdakilerden, anaerobik olarak üreyenler aerobik olarak üreyenlerden daha adhezif ve invaziftirler (17, 18). Konakçı makrofajları içinde hayatta kalamayan (19) ve konakçı peptidlerinin antimikrobiyal etkisine karşı dirençlilik gösteremeyen *Salmonella* Typhimurium mutantlarının (20), farelerde azalan virulans sergilediği rapor edilmiştir. Salmonellalar, makrofajlarda fagolizozom oluşumunu engeller. Reaktif oksijen radikallerini nötralize eder, fagozom içerisinde yaşamayı başarır (21, 22, 23). Günaydın ve Şen (24), Salmonellalarda adhezyon-invazyon-hücre içi yaşam kabiliyeti ile ilgili bilgilere *Salmonella* Patojenite Adaları (1-10) isimli derlemelerinde, ayrıntılı bir şekilde değinmişlerdir.

Salmonella Virulans Plazmidleri: Virulans plazmidleri önemli virulans genlerini taşırlar. Plazmidin virulans üzerine en önemli etkisi; dalak ve karaciğerde bakterinin üreme oranını arttırarak, sistemik enfeksiyonlara yol açmasıdır. *Salmonella* Typhimurium ve *Yersinia* spp.'lerin virulent suşları 50-90 bp plazmidler taşırlar. Plazmidlerin kaybı, farelerde bakterinin sistemik enfeksiyon meydana getirme kabiliyetini düşürür. Plazmid-free suşlar, mukozaya invaze olur, aynı zamanda dalak ve karaciğerden izole edilirler. Ancak, plazmid-taşımayan suşların oluşturduğu enfeksiyonlardaki bakteri sayısı, plazmid taşıyan suşların oluşturduğu enfeksiyonlardaki bakteri sayısından azdır. Virulans plazmidler birçok *Salmonella* serovarında mevcuttur fakat büyüklükleri serovardan serovara farklılık gösterir. Örneğin; *Salmonella* Typhimurium 95 kb, *Salmonella* Enteritidis 80 kb, *Salmonella* Dublin 80 kb, *Salmonella* Choleraesuis 50-110 kb büyüklüğünde plazmidler taşırlar (25). Virulans plazmidin 8 kb'lık bölgesi, *Salmonella* Typhimurium'un plazmid-taşımayan suşlarının farelerde sistemik enfeksiyon yapma kabiliyetini oluşturur. Bu bölge bü-

tün virulans plazmidlerinde vardır ve 5 gen içerir. Bunlar; *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* ve *spvD*'dir. *spvA-D*, bir operon içerisinde organize olmuştur. *spvR*, ayrı bir transkripsiyonel ünite içindedir ve regülatör genidir. *spvA-D* membran proteinlerini kodlar (26). 8 kb'lık bölge horizontal gen transferi sonucunda kazanılmıştır ve insersiyon elemanlarının hemen bitişiğine lokalize olmuştur, G+C içeriği (% 46), *Salmonella* Typhimurium kromozomunun tüm G+C içeriğinden daha düşüktür. *spvR*; besin elde etmek, üreme fazı gibi üreme koşullarına bağlı birçok regülatör faktör tarafından kontrol edilir. *spvA*, operonun negatif regülatördür. *spvBCD* ise membran ilişkili proteinlerdir. Tüm bunlardan çıkarılan sonuç, *spv* bölgesinin konakçıda *Salmonella*'nın yaşamasını, hızla üremesini ve virulansını arttırdığıdır (26, 27). Birçok araştırmacı makrofajlarda *spv*'nin rolü ile alakalı çalışmalar yapmış, *spv* gen ekspresyonunu ve intrasellüler olarak hayatta kalma arasında herhangi ilişki bulamamıştır (26, 27, 28, 29, 30). Gulig ve ark. (31), fare makrofajları, nötrofilleri ve lenfositlerinde, invitro şartlarda *Salmonella* Typhimurium üremesi üzerine *spv* bölgesinin etkisini araştırmıştır. Bu amaçla araştırmacılar, *Salmonella* Typhimurium'un plazmid-taşıyan ve plazmid taşımayan suşlarını denemiş ve sonuç olarak; incelenen hücre tipleri içinde sadece makrofajların plazmid ilişkili virulansla ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır. Gulig ve ark. (31)'nin çalışmasını destekler şekilde, bir başka çalışmada *Salmonella* virulans plazmid genleri ve konakçı makrofaj ve nötrofilleri arasında kompleks bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (32). BALB/c farelerde makrofajı eksprese eden gen; Nramp1'de nokta mutasyonu oluşturulmuş ve bu durumun fareyi *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı duyarlı kıldığı ortaya konmuştur. Normal makrofajlara sahip farelerde yapılan deneyde, fareler *Salmonella* Dublin'in plazmid taşıyan suşlarına karşı defans oluşturmak için polimorf nükleer lökositlere gereksinim duymuşlardır. Bu çalışma, virulans plazmidin etkili virulans mekanizmasının *Salmonella*'nın makrofajlar içinde yaşamasına müsaade ederken, polimorf nükleer lökositlere karşı koruyamadığını göstermektedir (32). *Spv* genlerinin apoptosis üzerindeki rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Sideroforlar: Demir birçok mikroorganizmanın üremesi için hayati bir elementtir. Aerobik koşullarda ve pH 7'den küçük olduğunda, demir bakterinin kullanabileceği ferrus formundadır. Anaerobik

koşullarda ve pH 7'den büyükken demir erimeyen ferik forma geçer ve çeşitli proteinlere bağlanır. Ferik demir mikroorganizmanın kullanacağı formda değildir. Bakteriler üremek için mikromolar düzeyde demire ihtiyaç duyarlar (33). Demir ya hem yapısında ya da ferritin, hemosiderin, laktoferrin gibi demir bağlayan proteinlere bağlanmış durumdadır. Salmonellalar, hayatta kalmak, üremek amacıyla demir kazanmak için çeşitli mekanizmalar geliştirirler. *Salmonella* ve birçok bakterinin demir kazanım mekanizması; sideroforlardır. Konak ile Salmonellalar demir kazanımı için yarışa girerler. Makrofajlarca salgılanan IL-1 demir bağlayan protein üretimini artırır. *Salmonella* demiri ararken daha çok invaze olur ve bu durum, bakterinin virulansına katkıda bulunur (33, 34). Sideroforlar demire yüksek bağlanma affinitesi gösteren, konak-demir bağlayan proteinlerden demiri kazanan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Bilinen en yaygın sideroforlar; enterobactin ve ve salmochelindir (33, 34). Sideroforlar sadece demir bağlanma konsantrasyonu çok düşük olduğunda üretilirler. Siderofor bakterinin demire gereksinimi olduğu yerde ortam içine salınır. Demir-siderofor kompleksi bakteri yüzeyindeki özel siderofor reseptörlerine bağlanır. Daha sonra TonB proteini iç ve dış membran enerjisini 2 katına çıkarır. Çeşitli periplazmik, iç membran transport proteinleri ve eriyebilir enzimler ferrisiderofor kompleksinden demiri ayırır. Salmonellalar sadece kendi sideroforlarını üretmezler, aynı zamanda diğer bakterilerin ürettiği sideroforlara bağlanma kabiliyetinde reseptörler de üretirler (33, 34).

Toksinler: *Salmonella* virulansında başlıca ekzotoksin ve endotoksin olmak üzere 2 tip toksin görev alır. Ekzotoksinler, sitotoksin ve enterotoksin olmak üzere 2'ye ayrılır.

1. Endotoksin: Gram negatif bakteri olan *Salmonella*, konak dokusuna girdikten birkaç dakika içinde akut yangı başlatır. Bu yangısal reaksiyonlardan sorumlu olan endotoksin aktivitesi gösteren bakteri hücre duvarıdır. Hücre duvarının endotoksin aktivasyonu göstermesinden sorumlu olan molekül, Lipopolisakkarittir (LPS). Endotoksin, hücre duvarı LPS'nin Lipid A kısmı ile ilişkilidir. Dokularda endotoksine yanıt veren yangı hücreleri; nötrofiller, makrofajlar ve endotel hücreleridir. LPS, nötrofillere etkiyerek integrinleri, endotel hücrelerine etkiyerek selektinleri ve makrofajlara etkiyerek si-

tokin üretimini aktive ederler (35). Bakteriyel hücre lize olup, kan dolaşımına salındığında endotoksin ateş oluşturur. Bakteriyel endotoksinin fagositoza dirençle de ilişkisi vardır fakat Salmonellalar proteolitik enzimlerle uygun ortam yaratmak yerine hücre içinde yaşamayı tercih ederler. Makrofajlar tarafından fagosite edilmelerine rağmen öldürülemezler. LPS'nin tam sentezlenmemesi, *Salmonella* Typhimurium'un dalağı infekte etme ve sekuma kolonizasyon yeteneğini azaltır (36). Peter ve ark. (37) lipopolisakkarit sergilenişinde kalitatif ve kantitatif farklılıkların *Salmonella* Enteritidis varyantlarında invazite özelliğini etkilediğini ortaya koymuşlardır.

2. Enterotoksin: Isıya duyarlı, protein tabiatında bir enzimdir. Barsak epitelyum hücrelerinde salgısal tepkiyi uyarır, barsak lumeninde sıvı toplanmasına neden olur (38).

3. Sitotoksin: Isıya dayanıklı bir toksindir. Protein sentezini inhibe eder ve barsak hücrelerinde yapısal hasara yol açar (39).

Serum Dirençliliği: *Salmonella* spp. konağı istila ettiğinde, komplement sistemini ekarte eder. Komplement aktivasyonunda direnç önemli bir virulans faktörüdür. Komplement dirençliliğine neden olan komponent LPS'nin uzun O-antijen yan zincirleridir (40). LPS'nin somatik (O) antijen yan zincirleri, dış membranla litik etkileşimi önlemek için Membran Atak Kompleksini (MAK), *Salmonella*'dan yeterli uzaklıkta tutarlar. C3 konvertaz oluşumunu engelleyerek, C5b LPS'ye bağlanır fakat çok daha uzak vaziyette konular. Oligosakkarit, komplemente karşı maske görevi görür (35). LPS dışında, 3 adet virulans plazmid geni de serum dirençliliğinde önemlidir: *trt*, *rck*, *rsk*. *Rck*; *Salmonella* Typhimurium virulans plazmidini üzerindeki bir gen tarafından kodlanır (41, 42). LPS'den bağımsız olarak, hem *Salmonella* Typhimurium hem de *Escherichia coli* (*E. coli*) yüksek seviyede serum dirençliliğine neden olur. *Rck*, C9 kompleksinin formasyonunu ve tubuler insersiyonunu engeller. *Rck*, aynı zamanda *Yersinia enterocolitica* invazini olan *Ail* ve *Salmonella*'nın makrofajlar içinde hayatta kalmasını sağlayan, *PagC* ile benzer aminoasitlere sahiptir (43). Fakat ne *Ail* ne de *PagC* serum dirençliliğinde etkin değildir (44). Serum dirençlilik plazmidlerinden en iyi tanımlanan, *Rck* geninde ufak aminoasit değişiklikleri yapılarak elde edilen mutantların, hem serum dirençliliği hem de hücreye invazyonda azalan virulans gösterdiği orta-

ya konmuştur (42). *Trat*; *Salmonella* Typhimurium plazmidinin transfer bölgesi tarafından kodlanan 27 kDa'lık bir proteindir. *Salmonella* serum dirençliliğinde *trat*'nin katkısı henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. *Trat* ilişkili dirençlilik yeni transfer edilen plazmidleri taşıyan Samonellalarda tespit edilmiş fakat 20 jenerasyon sonra gözden kaybolduğu ve sadece alternatif komplement yoluna karşı etkili olduğu ortaya konmuştur. *Rsk*'nin ise tam tanımlanamamakla birlikte; replikasyon proteini, *Rep A*'ya bağlanabilme kabiliyetine sahip regülatör element olduğu bildirilmiştir (41).

Salmonella Patojenite Adaları: *Salmonella enterica*'nın birçok virulans fenotipi, patojenite adaları üzerindeki genler tarafından kodlanır. *Salmonella* patojenite adaları, konak hücrelerine invazyon, intrasellüler patogenesis gibi birçok göze çarpan virulans fenotipini barındırırlar. Günümüzde karakterize ve identifiye edilen toplam 16 adet *Salmonella* patojenite adasının varlığı bildirilmiştir. Bazı *Salmonella* patojenite adaları, tüm *Salmonella* genusunda mevcutken, bazıları da sadece belirli serovarlar için spesifiktir. Günaydın ve Şen (2011) (24) tarafından ilk 10 patojenite adasıyla ilgili ayrıntılı bilgi, 'Salmonella Patojenite Adaları (1-10)' adlı derlemede sunulmuştur. Bu derlemede ise SPA-11, SPA-12, SPA-13, SPA-14, SGA-1, YPA hakkında bigilendirme yapılmaktadır.

1. Salmonella Patojenite Adası 11 (SPA-11): SPA-11, *Salmonella* Choleraesuis genomunun sekansı yapıldıktan sonra identifiye edilmiştir (45). Mozaik yapıda gözükten SPA-11'in sadece bazı bölümleri *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Typhi'de bulunmaktadır. SPA-11 Gifsy-1 profajının bitişiğine inserte olan ve *Salmonella* Choleraesuis genomunda 14 kb'lık uzunluğa sahip bir adadır. Bu ada üzerindeki birçok gen *Salmonella* Typhimurium virulansında önemlidir. Bunlardan bazıları; *slyA* tarafından regüle edilen *PagC* ve *PagD* genleri, birçok virulans geninin regülatörü olan PhoP/PhoQ ikili komponent sistemidir (46, 47). *PagC* farelerde makrofajlar içinde hayatta kalma ve sistemik infeksiyonlardan sorumlu olup (48), aynı zamanda *Salmonella* Choleraesuis'in serum dirençliliğine yardımcı olur (49). *PagD* ve *MsgA*, *Salmonella* Typhimurium'un makrofajlar içinde hayatta kalmasını sağlarken, *MsgA* duyarlı farelerde sistemik infeksiyonların patogenezisinden sorumludur (46). Ada içerisinde mevcut olan *envE* ve *envF* genlerinin

zarf proteinlerini kodladığı düşünülmektedir, fakat bunlar farelerde virulans için gerekli değildir (46).

2. Salmonella Patojenite Adası 12 (SPA-12): SPA-11 gibi, SPA-12'de *Salmonella* Choleraesuis'in sekans analizleri sonrasında identifiye edilmiştir (45). SPA-11'den farklı olarak, SPA-12 *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Typhi genomunda da mevcuttur. Bu ada, *proL* tRNA genine inserte olmuş ve *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Choleraesuis genomunda 6.3 kb uzunluğunda bir lokalizasyondur (50). SPA-12'nin tek karakterize edilen virulans faktörü, *SspH2*'dir. Bu, TTSS-2'nin salgılanan efektör proteindir ve infekte hücrelerde aktin-polymerizasyonunu etkiler (51) ve buzağılarda virulansa katkısı vardır (52).

3. Salmonella Patojenite Adası 13 (SPA-13): SPA-13, *Salmonella* Typhimurium tam genom sekansında bulunmasına rağmen, yakın zamana kadar SPA olarak tanımlanmamıştır (53). Ada, *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Choleraesuis'te *phe* tRNA geninin bitişiğine inserte olmuş, 19.5 kb uzunluğunda bir lokalizasyondur. tRNA genine bitişik olan adanın, 7.4 kb'lık bölümü *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Paratyphi A'da mevcut değildir, bunun yerini SPA-8 almıştır ki, bu durum adanın mozaik yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu ada üzerinde toplam 18 genin sadece 3 tanesi virulans rol oynar. Bu genler; *gacD*, *gtrA* ve *gtrB*, 1 günlük civcivlerin infeksiyon modelinde *Salmonella* Gallinarum'un virulansı için gereklidir (53).

4. Salmonella Patojenite Adası 14 (SPA-14): Bu ada, *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Choleraesuis'te mevcutken, *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Paratyphi A'da bulunmamaktadır. Günlük civcivlerde *Salmonella* Gallinarum'un virulansı için gerekli olan ve bu ada üzerinde taşınan 2 genin (*gpiAB*) identifikasyonunu takiben SPA-14, patojenite adası olarak kabul görmüştür (53).

5. Salmonella Genomik Ada (SGA-1): *Salmonella* Typhimurium DT104, DT120'nin epidemik suşlarında ve *Salmonella enterica*'nın bazı diğer serovarlarında bulunan antibiyotik dirençlilik genlerini barındıran 43 kb'lık bir gen kümesidir (54). SGA-1, konjugatif mobilizasyon boyunca invitro olarak serovarlar arasında transfer edilebilen integratif mobilize bir elemandır. Bundan dolayı, antibiyotik dirençlilik genlerinin yayılımına yardımcı olduğu düşünülmektedir (55). SGA-1'de beşli dirençlilik fenotipini (tetrasiklin, ampisilin,

kloramfenikol, streptomisin ve sulfonamidler) barındıran genler, 2 integrondan oluşan çoklu-dirençlilik bölgesinde kümelenmiştir. Buna ilaveten, SGA-1'de kriptik retronfaj tanımlanmıştır (22). SGA-1 varyantları, aynı kromozomal lokasyonda, horizontal transferi ve bölge spesifik rekombinasyonu doğrular vaziyette, diğer serovarlarda da identifiye edilmiştir. Çok yakın zamanda, SGA-1'in yeni varyantı, *Salmonella* Albany'de bulunmuştur (22). Bu varyantta, streptomisin dirençlilik genini içeren SGA-1'de bir integronun yerine trimetoprim dirençlilik genini bulduran başka bir integron geçmiştir. Bu gözlemler, kromozomal antibiyotik dirençlilik lokusunun yeni kazanıldığını ve antibiyotik dirençliliğine adaptasyonda sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (22).

6. Yüksek Patogenite Adası (YPA): İlk olarak *Yersinia* spp'de karakterize edilen, insanlar ve fareler için oldukça virulent olan, *Enterobacteriaceae* familyasının birçok üyesinde de bulunan bir adadır (22). YPA, *Salmonella enterica* subsp. III ve IV'te bulunmaktadır ve bu adayı taşıyan izolatlar demirden yoksun şartlar altında 'Demir Şelat Yersiniabactin' üretirler Bu adanın varlığı, suşların septisemik infeksiyonlar yapma kabiliyeti ile koreledir. YPA'nın alt tür IIA, IIB, ve IV'te varolduğu rapor edilmiştir. (56).

Sonuç

Salmonella serovarlarının konak bariyerlerini geçip infeksiyon başlatma ve hastalık yapabilme kabiliyetine nasıl edindiğini anlamının en doğru yolu; evrimsel süreç boyunca gerek bakterinin kendisinde mevcut olan ve/veya horizontal gen transferi sonucunda kazandığı virulans faktörleri yardımıyla, bakterinin konağı kendi çıkarları için kullanabilmesini ve bu amaç için bünyesinde mevcut olan ve/veya geliştirdiği mekanizmaları anlamaktan geçmektedir.

Kaynaklar

1. Grimont PAD, Weill FX, (2007). *Antigenic formulae of Salmonella serovars*. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur, 9th revision.
2. Muthukkaruppan VR, Borysenko M, Ridi REI, (1982). *RES structure and function in reptilia*. Cohen N, Sigel MM. eds. The Reticuloendothelial System. Plenum Pres, New York. p.461-508.
3. Glick B, (1982). *RES structure and function in aves*. Cohen N, Sigel M M. Eds. The Reticuloendothelial System. Plenum Pres, New York. p.509-540.

4. Manning MJ, (1979). *Evolution of the vertebrate immune system*. J R Soc Med. 72, 683-688.
5. Du Pasquier L, (1993). *Phylogeny of B-cell development*. Curr Opin Immunol. 5, 185-193.
6. Zapata AG, Torroba M, Vicente A, Varas A, Sacedon R, and Jimenez E, (1995). *The relevance of cell microenvironments for the appearance of lymphohaemopoietic tissues in primitive vertebrates*. Histol Histopathol. 10, 761-778.
7. Du Pasquier L, (1982). *Antibody diversity in lower vertebrates-why is it so restricted?* Nature. 290, 311-313.
8. Jonsson V, (1985). *Comparison and definition of spleen and lymph node: a phylogenetic analysis*. J Theor Biol. 117, 691-699.
9. Du Pasquier L, (1989). *Evolution of the immune system*. Paul WE. eds. Fundamental Immunology. Raven Pres, New York. p. 139-165.
10. Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA, (1994). *Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system*. Infect Immun. 62, 4602-4610.
11. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F, (1986). *Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci. 83, 5189-5193.
12. Vladoianu IR, Chang HR, Peche're JC, (1990). *Expression of host resistance to Salmonella typhi and salmonella typhimurium: bacterial survival within macrophages of murine and human origin*. Microb Pathog. 8, 83-90.
13. Suarez M, Rüssmann, (1998). *Molecular mechanisms of Salmonella invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island I*. Microbiol. 1, 197-204.
14. Kusters JG, Mulders-Kremers GAWM, van Doornik CEM, van der Zeijst, (1993). *Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 61, 5013-5020.
15. MacBeth KJ, Lee CA, (1993). *Prolonged inhibition of bacterial protein synthesis abolishes Salmonella invasion*. Infect Immun. 61, 1544-1546.
16. Amin IL, Douce GR, Osborne MP, Stephen J, (1994). *Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by Salmonella typhimurium strain which differ in virulence in a model of gastroenteritis*. Infect Immun. 62, 569-578.
17. Ernst RK, Dombroski DM, Merrick JM, (1990). *Anaerobiosis, type I fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of Hep-2 cells by salmonella typhimurium*. Infect Immun. 58, 2014-2016.
18. Lee CA, Falkow S, (1990). *The ability of Salmonella to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state*. Proc Natl Acad Sci USA. 87, 4304-4308.
19. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F, (1986). *Mutants of Salmonella typhimurium that can not survive within macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci USA. 83, 5189-5193.
20. Groisman EA, Parra-Lopez C, Salcedo M, Lipps CJ, Heffron F, (1992). *Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for Salmonella virulence*. Proc Natl Acad Sci USA, 11, 939-943.
21. Sandra LM, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB, (2000). *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. Microb Infec. 2, 145-156.
22. Hensel M, (2004). *Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica*. Int J Med Biol. 291, 95-102.
23. 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.

24. Günaydın E, Şen S, (2011). *Salmonella patojenite adaları (1-10)*. J Etlik Vet Mikrobiol Derg. 22, 79-82.
25. Chu C, Hong SF, Tsai C, Lin WS, Liu TP, Ou JT, (1999). *Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of Salmonella enterica serovars typhimurium, enteritidis, choleraesuis, and Dublin*. Infect Immun. 67, 2611-2614.
26. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H, (2006). *Distribution and function of plasmids in Salmonella enterica*. Vet Microbiol. 112, 1-10.
27. Fierer J, Eckmann L, Fang F, Pfeifer C, Finlay BB, Guiney D, (1993). *Expression of the Salmonella virulence plasmid gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic cells*. Infect Immun. 61, 5231-5236.
28. Guilloteau LA, Wallis TS, Gautier AV, Macintyre S, Platt DJ, Lax AJ, (1992). *The Salmonella virulence plasmid enhances Salmonella-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses*. Infect Immun. 64, 3385-3393.
29. Rhen M, Riikonen P, Taira S, (1993). *Transcriptional regulation of Salmonella enterica virulence plasmid genes in cultured macrophages*. Mol Microbiol. 10, 45-56.
30. Riikonen P, Makela PH, Saarilahti H, Sukupolvi S, Taira S, Rhen M, (1992). *The virulence plasmid does not contribute to growth of Salmonella in cultured murine macrophages*. Microb Pathog. 13, 281-291.
31. Gulig PA, Doyle TJ, Hughes JA, Matsui H, (1998). *Analysis of host cells associated with the Spv-mediated increased intracellular growth rate of Salmonella typhimurium in mice*. Infect Immun. 66, 2471-2485.
32. Vassiloyanakopoulos AP, Okamoto S, Fierer J, (1998). *The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to Salmonella dublin infections in genetically susceptible and resistant mice*. Proc Natl Acad Sci. 95, 7676-7681.
33. Visca P, Filetici E, Anastasia MP, Vetriani C, Fantasia M, Orsi N, (1991). *Siderophore production by Salmonella species isolated from different sources*. FEMS Microb Letters. 79, 225-231.
34. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann (2003). *Salmochellins, siderophores of Salmonella enterica and uropathogenic Escherichia coli strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN*. PNAS. 100, 3677-3682.
35. Diker KS, (2005). *İmmunoloji*. İkinci baskı. Medisan Yayın Evi, Ankara, p. 125-137.
36. Chart H, Row B, Threlfall, Ward LR, (1989). *Conversion of Salmonella enteritidis phage type 4 to phage 7 involves loss of lipopolysaccharide concomitant loss of virulence*. FEMS Microbiol Lett. 60, 37-40.
37. Guard-Petter J, Keller LH, Rahman MM, Carlson RW, Silvers S, (1996). *A novel relationship between O-antigen variation, matrix formation, and invasiveness of Salmonella enteritidis*. Epidemiol Infect. 117, 219-231.
38. Chopra AK, Hoang JH, Xu XJ, Burden K, Niesel DW, Rosenbaum MW, Popov VL, Peterson JW, (1999). *Role of Salmonella enterotoxin in overall virulence of the organism*. Microb Pathogen. 27, 155-171.
39. Haghjoo E, Galan JE, (2004). *Salmonella typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial internalization pathway*. Proc Natl Acad Sci USA. 101, 4614-4619.
40. Bravo D, Silva C, Carter JA, Hoare A, Alvarez SA, Blondel CJ, Zaldivar M, Valvano MA, Contreras I, (2008). *Growth phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of Salmonella*. J Med Microbiol. 57, 938-946.
41. Rötger R, Casadesús I, (1999). *The virulence plasmids of Salmonella*. J Internat Microbiol. 2,177-184.
42. Cirillo DM, Heffernan EJ, Wu L, Harwood J, Fierer J, Guiney DG, (1996). *Identification of a domain in Rck, a product of the Salmonella typhimurium virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion*. Infect Immun. 64, 2019-2023.
43. Heffernan EJ, Harwood J, Fierer J, Guiney D, (1992). *The Salmonella typhimurium virulence plasmid complement resistance gene rck is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including pagC and ail*. J Bacteriol. 174, 84-91.
44. Heffernan EJ, Wu L, Louie J, Okamoto S, Fierer J, Guiney DG, (1994). *Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes rck from Salmonella typhimurium and ail from Yersinia enterocolitica*. Infect Immun. 62, 5183-5186.
45. Chiu CH, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, Chou YY, Wang HS, Lee YS, (2005). *The genome sequence of Salmonella enterica serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen*. Nucleic Acids Res. 21, 1690-1698.
46. Gunn JS, Alpuche-Aranda CM, Loomis WP, Belden WJ, Miller SI, (1995). *Characterization of the Salmonella typhimurium pagC/pagD chromosomal region*. J Bacteriol. 177, 5040-5047.
47. Navarre WW, Halsey TA, Walthers D, Frye J, McClelland M, Potter JL, Kenney LJ, Gunn JS, Fang FC, Libby SJ, (2005). *Co-regulation of Salmonella enterica genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ*. Mol Microbiol. 56, 492-508.
48. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ, (1989). *A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A. 86, 5054-5058.
49. Nishio M, Okada N, Miki T, Haneda T, Danbara H, (2005) *Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in Salmonella enterica serovar Choleraesuis*. Microbiology. 151, 863-873.
50. Hansen-Wester I, Hensel M, (2002). *Genome-based identification of chromosomal regions specific for Salmonella spp*. Infect Immun. 70, 2351-2560.
51. Miao EA, Brittnacher M, Haraga A, Jeng RL, Welch MD, Miller SI, (2003). *Salmonella effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton*. Mol Microbiol. 48, 401-415.
52. Miao EA, Scherer CA, Tsois RM, Kingsley RA, Adams LG, Bäumlér AJ, Miller SI, (1999). *Salmonella typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems*. Mol Microbiol. 34, 850-864.
53. Shah DH, Lee MJ, Park JH, Lee JH, Eo SK, Kwon JT, Chae JS, (2005). *Identification of Salmonella gallinarum virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis*. Microbiology. 151, 3957-3568.
54. Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR, (2001). *Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona*. J Bacteriol. 183, 5725-532.
55. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckert A, (2005). *The Salmonella genomic island I is an integrative mobilizable element*. Mol Microbiol. 55, 1911-1924.
56. Oelschlaeger TA, Zhang D, Schubert S, Carniel E, Rabsch W, Karch H, Hacker J, (2003). *The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of Salmonella enterica subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI*. J Bacteriol. 185, 1107-1111.