

Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nün bilimsel yayın organı olup, yılda bir kez yayınlanır. Derginin kısaltılmış adı Bornova Vet. Bil. Derg.'dir.

The Journal of İzmir/Bornova Veterinary Science is the scientific publication of Bornova Veterinary Control Institute Directorate, which is published once a year. The designation of the journal is J. Bornova Vet. Sci.

**İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
Adına Sahibi**

Necdet AKKOCA
Müdür

Yayın Kurulu/Editorial Board

Dr. Öznur YAZICIOĞLU
Dr. M.Ziyet GÜNEN
Dr. M. Melih SELVER

**Bu sayıda görev alan Yayın Danışmanları
(Board of Scientific Reviewers of this issue)**

Prof. Dr. Ferda AKAR
Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN
Prof. Dr. Tayfun ÇARLI
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Prof. Dr. Merih HAZIROĞLU
Prof. Dr. Sezai KAYA
Prof. Dr. Kamil ÖCAL
Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU
Prof. Dr. Sibel YAVRU

*İsimler soyadına göre alfabetik sırayla yazılmıştır.

**Yazışma Adresi
(Correspondance Address)**

İzmir/ Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Erzene Mah. Ankara Cad. No. 172-155
35040 Bornova / İZMİR
Tel: 0 (232) 388 00 10
Fax: 0 (232) 388 50 52
E-posta: bornova@bornovavet.gov.tr
dergi@bornovavet.gov.tr
Web site: <http://bornovavet.gov.tr>
Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli

Bu dergi, 1999 yılına kadar "Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi", 1999-2010 yılları arasında TÜBİTAK-ULAKBİM ve CAB International'ın Yaşam Bilimleri Veritabanlarında yer alan "Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi" adı ile yayınlanmıştır.

This journal was published with the name of "The Journal of Bornova Veterinary Control and Research Institute", which was in Life Sciences Databases of TUBİTAK-ULAKBİM ve CAB International, between 1999 and 2010 and "The Journal of Veterinary Control and Research Institute Directorate" until 1999

BORNOVA VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

*The Journal of
Bornova
Veterinary
Science*

ISSN 2146-7447

Cilt/Volume: 33 Sayı/Number: 47 Yıl/Year: 2011

© Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi. Tüm hakları saklıdır / All rights reserved. Hakemli bir dergidir.

Bu derginin tamamı ya da dergide yer alan bilimsel çalışmaların bir kısmı ya da tamamı 5846 sayılı yasanın hükümlerine göre İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nün yazılı izni olmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemi ile çoğaltılamaz, yayımlanamaz.

Basım Tarihi/ Publishing Date: Aralık 2011/ December 2011. Baskı Adedi / Print Count: 500.

Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri

87 Sok. No. 4 / A Bornova

☎ (0.232) 343 64 54 ✉ metabasim@gmail.com

İzmir, 31 Aralık - 2011

ÖNSÖZ

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 03.06.2011 tarih ve 639 sayılı Teşkilat ve Görevlerindeki Kanun Hükmündeki Kararname gereği; Bakanlığın yeniden yapılanması çerçevesinde Enstitü Müdürlüğü'nün ismi "İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü" olarak değişmiştir. Bu kapsamda; "Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi" adı ile yayınlanan dergimizin isminin de değiştirilmesi gereklilik arz etmiştir.

Yayın hayatına 1959 yılında başlayan ve uzun süre "Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi" adı altında ve 1300-8307 ISSN numarası ile yılda bir kez yayınlanan dergimiz, bu sayısından itibaren "Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi" adı altında ve 2146-7447 ISSN numarası ile ulusal, bilimsel ve hakemli bir dergi olarak yayın hayatına devam edecektir.

Bornova Veteriner Bilimleri Dergisinin bu sayısında; yayınlarıyla dergimizin bilimsel düzeyini yükselten bilim adamlarına ve araştırmacılarımıza, makaleleri titizlikle inceleyip yayın sahiplerine yayınlarıyla ilgili bilimsel katkı sağlayan Yayın Danışmanlarımıza, Enstitümüz Araştırma ve Yayın Komitesi'nin değerli üyelerine ve her zaman ülkesi ve toplumuna karşı sorumluluk bilinci içinde hareket eden tüm Enstitü personeline teşekkür ederim.

Necdet AKKOCA

Müdür

İÇİNDEKİLER

CONTENTS

Araştırma Makaleleri/ Research Articles

Çift kabuklu yumuşakçalardan *Vibrio Parahaemolyticus* izolasyonu

Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from bivalve molluscs

Necla TÜRK, Murat YABANLI, Meriç Lütfi AVSEVER, Mehmet Ali AYDIN

1

İnfeksiyöz bursal hastalığı saha ve aşı viruslarının antijenik ve patojenik özellikleri yönünden moleküler analizi

Molecular analysis of infectious bursal disease field and vaccine viruses for their antigenic and pathogenic characteristics

Olca TÜRE GÖKSU, Fethiye ÇÖVEN

9

The investigation of *tdh* and *trh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from bivalve molluscs with multiplex polimerase chain reaction

Çift kabuklu yumuşakçalardan izole edilen *Vibrio parahaemolyticus* izolatlarının

tdh ve *trh* genlerinin multiplex polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması

Necla TÜRK, Meriç Lütfi AVSEVER, Cemal ÜN

29

Tüketime sunulan ballarda sülfonamid türevi antibiyotiklerin kalıntılarının belirlenmesi

Determination of sulphonamide antibiotics residues in honey presented for consumption

A. Turan ERDOĞDU, Yasemin COŞKUN, Sema İSPİRLİ GÜVEN

37

Derleme/ Review

İngiliz atlarında sakatlık nedenlerine anatomik yaklaşımlar

Anatomic approaches on reason of injuries in Thoroughbred horses

İ. Gökçe YILDIRIM, Hasan ERDEN

45

ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARDAN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* İZOLASYONU

ISOLATION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* FROM BIVALVE MOLLUSCS

Necla TÜRK¹ Murat YABANLI² Meriç Lütfi AVSEVER³ Mehmet Ali AYDIN⁴

Geliş Tarihi (Received): 21.01.2011

Kabul Tarihi (Accepted): 15.08.2011

ÖZET

Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne 2004–2009 yılları arasında gelen toplam 1330 adet canlı çift kabuklu yumuşakça numunesi TS ISO/8914'e göre muayene edildi ve *Vibrio parahaemolyticus*'un varlığı % 4.28 (57/1330) olarak saptandı. Çift kabuklu yumuşakça türlerine göre *V. parahaemolyticus* izolasyon oranı; kum şırlanında (*Donax trunculus*, L. 1758) % 8.92, istiridyede (*Ostrea edulis*, L. 1758) % 8.65, kidonyada (*Venus verrucosa*, L. 1758) % 2.94, akivadeste (*Tapes decussatus*, L. 1758) % 2.71, kıllı midyede (*Modiolus barbatus*, L. 1758) % 1.93 ve kara midyede (*Mytilus galloprovincialis* L. 1819) % 1.90 olarak bulundu. Kum midyesi (*Chamelea gallina* L., 1753) örneklerinden ise *V. parahaemolyticus* izole edilmedi. İzole edilen toplam 57 *V. parahaemolyticus* izolatının 21'i (% 36.8) Kanagawa Fenomeni (KP) pozitif, % 7'si (% 12.2) üre hidroliz testi (UH) pozitif bulundu. Sonuç olarak, çift kabuklu yumuşakçalardan sağlanan *V. parahaemolyticus* izolatlarının insan sağlığı yönünden riskli olabileceği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Canlı çift kabuklu yumuşakça, *Vibrio parahaemolyticus*.

SUMMARY

A total of 1330 samples of live bivalve molluscs that come to the Bornova Veterinary Control and Research Institute between 2004–2009 were analysed according to TS ISO/ 8914. The isolation rate of *Vibrio parahaemolyticus* was 4.28 % in bivalve molluscs tested. The isolation rate of the organism in bivalve molluscs were as follows; 8.65 % in oysters (*Ostrea edulis*, L. 1758), 8.92 % in wedge shells (*Donax trunculus*, L. 1758), 2.94 % in cockles (*Venus verrucosa*, L. 1758), 2.71 % in carpet shell clams (*Tapes decussatus* L. 1758), 1.93 % in bearded mussels (*Modiolus barbatus*, L. 1758) and 1.90 % in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*, L. 1819). *V. parahaemolyticus* was not isolated in striped Venus (*Chamelea gallina* L., 1753). Out of the 57 *V. parahaemolyticus* isolates, 21 (36.8 %) were found to be positive for Kanagawa Phenomenon (KP) and 7 (12.2 %) for urea hydrolysis (UH). As a result, we concluded that *V. parahaemolyticus* isolates from bivalve molluscs which we obtained may pose a risk for human health.

Key words: Live bivalve molluscs, *Vibrio parahaemolyticus*.

GİRİŞ

Çift kabuklu yumuşakçalar yaşadıkları ortamdan veya nakliye, işleme, pazarlama esnasında birçok mikroorganizma ile kontamine olabilmektedir. Bu hayvanların hareketsiz olması ve deniz

suyunu süzerek beslenmesi, ortamdaki bakterilerle kontaminasyonlarını artırmakta ve özellikle çiğ ve az pişmiş olarak tüketildiğinde insanlarda gıda zehirlenmeleri meydana gelmektedir (19, 20, 64). Deniz ürünleri ile insanlara bulaşan önemli bakteriyel patojenlerin başında ılık kıyı sularının mikro-

¹Uzman Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR.

²Dr. Biyolog, Muğla Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Anabilim Dalı, MUĞLA.

³Dr. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR.

⁴Biyolog, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR.

florasında da yaygın olarak bulunan *Vibrio* türleri yer almaktadır (11, 20, 39, 54, 64).

V. parahaemolyticus, ilk kez 1953 yılında Japonya'da Fujino ve ark. (26) tarafından deniz ürünlerini tüketen insanlarda görülen akut gastroenteritlerden izole edilmiştir. Halofilik ve mezofilik aerob bir bakteri olan etken, soğuğa karşı oldukça dirençli olduğundan soğutulmuş ve dondurulmuş deniz ürünlerinde uzun süre canlı kalabilmektedir (23, 19, 53, 61, 65). Deniz ürünlerinde etkenin başlangıçta az sayıda olduğu, ancak bakterinin hızlı üreme kabiliyeti ve düşük ısıya dayanıklı olması nedeniyle tüketiciye ulaşıncaya kadar bu sayının hızla arttığı, zehirlenmelerin önlenmesinde ürünlerin pişirilerek tüketilmesi gerektiği bildirilmiştir (1, 7, 12, 14, 17, 24, 65).

Yapılan çalışmalarda (13, 24, 25, 33, 61) tüketime sunulan deniz ürünlerinde etkenin izolasyon sıklığı sırasıyla , % 1.4, % 45.7, % 4.68, % 29.3, %71.4 olarak bildirilmiştir. Çift kabuklu yumuşakçalar ile yapılan çalışmalarda (11, 13, 25, 29, 54, 61, 63) ise etkenin izolasyon sıklığı sırasıyla % 26, % 4.3, % 19.9, % 25, % 12, % 44 ve % 15 olarak rapor edilmiştir.

V. parahaemolyticus ile kontamine ürünleri tüketen insanlarda şiddetli akut gastroenteritler şekillenmektedir. Bakterinin ısıya dayanıklı bir hemolizin olan enterotoksin üreterek bu etkiyi oluşturduğu saptanmıştır (7, 10, 20, 22, 38, 55). *V. parahaemolyticus*, termostabil olan O antijeni, termolabil olan K antijeni ve flagellar H antijenine sahiptir. Bakteri, K antijenlerine göre 69, O antijenlerine göre ise 11 serotipe ayrılmıştır (11, 49, 51, 57, 62). Ancak bakterinin serotiplerinden daha ziyade hemolitik tiplerinin saptanmasının önem taşıdığı bildirilmektedir (3, 10, 14, 21, 31, 43, 50). Bakterinin hemolitik özelliği, Wagatsuma Agarda Kanagawa-Fenomeni (KP) oluşumu (β -hemoliz) gözlenerek ortaya konmaktadır (3, 37, 44, 47, 50).

Yapılan çalışmalar (14, 22, 42, 44, 68), *V. parahaemolyticus*'un bazı suşlarının termostabil direkt hemolysin (*tdh*) ve *tdh* related hemolysin (*trh*) geni taşıdığı ve bu genlerden birini ya da ikisini de taşıyan suşların insan için patojen olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca araştırmacılar, *trh* geni taşıyan suşların genelde üreyi hidrolize (UH⁺)

ettiğini, *tdh* pozitif suşların KP⁺ olduğunu bildirmektedir (10, 37, 44, 60). Su ve su ürünlerinden izole edilen *V. parahaemolyticus* suşlarının % 2'si hemolitik karakterde olmasına karşın, bu oran hasta insan dışkılarından izole edilen suşlarda % 93–96.5 olarak bildirilmiştir (8, 34, 47, 59, 62, 64).

İnsan tüketimine sunulan deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* ile ilgili Avrupa Ülkeleri (11, 21, 29, 41, 54, 55, 63), Amerika (8, 16, 17, 19, 20, 37), Japonya (3, 26, 31, 32, 38, 45), diğer Asya Ülkeleri (14, 18, 24, 27, 46, 52, 53) ve Dünyanın farklı bölgelerinde (1, 5, 9, 13, 25, 61) çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Türkiye'de de çift kabuklu yumuşakça, taze ve işlenmiş deniz balıklarında etkenin varlığı ve patojenite genleri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (2, 6,15, 33, 35, 58, 60).

Bu makalede, Ege Bölgesi'ndeki çift kabuklu yumuşakça üretim ve avlanma alanlarından rutin veya izleme programları çerçevesinde laboratuvara gönderilen yumuşakça örneklerinde yapılan *V. parahaemolyticus* muayene sonuçları değerlendirilmiştir. Ayrıca izole edilen suşların KP ve UH sonuçları da irdelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çift kabuklu yumuşakça numuneleri: Materyal olarak 2004-2009 yılları arasında Ege Bölgesinden Eylül-Mayıs aylarında Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne çift kabuklu yumuşakça istasyonlarının bakteriyolojik izlemelelerinin yapılması amacıyla gönderilen toplam 1330 adet ürün numunesi kullanıldı.

***V.parahaemolyticus* suş:** ATCC 17802 standart suş Pasteur Enstitüsü'nden sağlandı.

Besi yerleri: Pepton seyreltme sıvısı (Oxoid CM9), Thio-sulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS, Oxoid CM333), üçlü tüp besi yerleri, peptonsuz Falkov besi yerleri, Wagatsuma Kanlı Agar (WKA) (37), Hugh-Leifson besi yerleri (HLB), Clark-Lups besiyeri (CLB), Tyriptic Soy Broth (TSB, Difco 070-17-3) ve Christensen üre agar (Oxoid, CM0053) kullanıldı.

Ayraçlar: Kovac's ayracı, Nitrat redüksiyon ayraçları (A ve B solüsyonları), TDA ayracı, oksidase sticks (Oxoid BR64), ONPG diskleri (Oxoid), novobiocin diskleri (Oxoid NV30), O/129 diskleri (Oxoid DD15), şeker vasatı, karbonhidrat solüsyonları ve fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanıldı.

Kit: VITEK II Compact cihazıyla identifikasyon yapmak amacıyla GN 32 kitleri kullanıldı.

Metot

Bu çalışmada *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyon ve identifikasyonu, TS/ISO 8914 standardına göre yapılmıştır (4).

İzolasyon Çalışmaları: Ön zenginleştirme amacıyla ürünlerin etlerinden 25 g 225 ml % 3 NaCl içeren peptonlu suya konuldu ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ön zenginleştirme besiyerinden bir öze dolusu alınarak TCBS besi yerine çizgi ekim yapıldı. 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra üreyen 2-3 mm çapında, mavi-yeşil renkli ortası koyu kolonilerden flagellar hareketli, oksidaz pozitif, gram negatif kıvrık çomak şeklinde olanlardan subkültür yapıldı.

İdentifikasyon Çalışmaları: Glikoz pozitif (oksidatif); laktoz, H₂S, ONPG, TDA negatif; LDC, mannitol, nitrat redüksiyon pozitif; üre değişken (% 90 negatif); Voges-Proskauer (VP) negatif, Metil Red (MR) ve indol pozitif; oksidatif/fermantatif, ADH, esculin hidroliz ve ornitin dekarboksilaz pozitif; O/129 vibriostat ve novobiocine duyarlı; 42°C'de üreme pozitif; % 0 ve % 10 NaCl'de üreme negatif olan bakteriler *V. parahaemolyticus* olarak değerlendirildi (4). Klasik yöntemle *Vibrio parahaemolyticus* olarak identifiye edilen suşlar, VITEK II cihazı ile teyit edildi. İzolatlara ayrıca KP ve UH testleri yapıldı. Kanagawa Fenomeni için insan kanı ile hazırlanmış Wagatsuma Kanlı Agar kullanılırken, üre hidroliz testi için tuzlu üre hidroliz besi yeri kullanılmıştır (37, 44).

BULGULAR

Çift kabuklu yumuşakça ürünlerinde *V. parahaemolyticus* görülme sıklığı % 4.28 (57/1330) olarak tespit edildi. Çalışmada kullanılan yumuşakça materyallerinin yıllara göre dağılımı ve *V. parahaemolyticus* izolasyon sayıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çift kabuklu yumuşakça materyallerinin ve *V. parahaemolyticus* yönünden pozitif materyallerin yıllara göre dağılımı.

Materyal	2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	Ö	İY	Ö	İY	Ö	İY	Ö	İY	Ö	İY	Ö	İY
Akivades	48	1	50	1	61	1	44	1	48	1	44	3
Kara midye	66	2	75	-	64	2	43	1	14	-	-	-
İstridye	47	4	49	2	55	5	50	8	50	4	61	4
Kıllı midye	34	-	37	-	23	2	23	-	24	-	14	1
Kidonya	24	1	24	-	20	-	22	1	24	-	22	2
Kum şırlanı	21	3	24	-	23	2	18	1	13	3	13	1
Kum Midyesi	-	-	-	-	-	-	-	-	58	-	-	-
Genel Toplam	240	11	259	3	246	12	200	12	231	8	154	11
Görülme Sıklığı (%)	4.58		1.15		4.87		6		3.46		7.14	

Ö: Örnek sayısı İY: İzolasyon yapılan örnek sayısı

Tablo 2. İzolatların çift kabuklu yumuşakça türlerine göre dağılımları, KP ve UH özellikleri.

Çift Kabuklu Yumuşakça Türü	Örnek Sayısı	İzolat Sayısı	%	KP ⁺	%	UH ⁺	%
Akivades	295	8	2.71	2	25	1	12.5
Kara Midye	262	5	1.90	1	20	-	-
İstiridye	312	27	8.65	11	40.7	4	14.8
Kıllı Midye	155	3	1.93	-	-	-	-
Kidonya	136	4	2.94	2	50	-	-
Kum Şırlanı	112	10	8.92	5	50	2	20
Kum Midyesi	58	-	-	-	-	-	-
Toplam	1330	57	4.28	21	36.8	7	12.2

Yıllar bazında izolasyon sıklığı değerlendirildiğinde en düşük oranın (% 1.15) 2005 yılında, en yüksek oranın (% 7.14) ise 2009 yılında olduğu görüldü.

İncelenen çift kabuklu yumuşakçalarda tür bazında *V. parahaemolyticus* izolasyon (müspet materyal sayısı/incelenen materyal sayısı) sıklığı, % 8.65 (27/312) istiridye, % 8.92 kum şırlanı (10/112), % 2.71 akivades (8/295), % 1.90 kara midye (5/262), % 2.94 kidonya (4/136) ve % 1.93 kıllı midye (3/155) olarak belirlendi. Muayene edilen 58 adet kum midyesi numunesinden ise etken izole edilmemiştir (Tablo 2).

İzole edilen 57 adet *V. parahaemolyticus* izolatının 21'i (% 36.8) KP⁺, 7'si (% 12.2) UH⁺ bulundu (Tablo 2).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmalar, *V. parahaemolyticus*'dan kaynaklanan gıda enfeksiyonlarının Uzak Doğu ve Asya Ülkeleri başta olmak üzere tüm Dünya'da yaygınlaştığını ve vaka sayısının da her geçen gün arttığını ortaya koymaktadır (3, 32, 39, 61). Çift kabuklu yumuşakça avlanma/üretim alanlarında 1999 yılından bu yana AB ülkelerinde ve ülkemizde *V. parahaemolyticus* izleme çalışmaları zorunlu olarak yürütülmektedir (2, 40).

Bu çalışmada Ege Bölgesindeki çift kabuklu yumuşakça avlanma/üretim alanlarından izleme amaçlı alınan 1330 yumuşakça numunesinin 57 tanesinden (% 4.28) *V. parahaemolyticus* izole edilmiştir. Numuneleri oluşturan çift kabuklu yumuşakça türleri istiridye, akivades, kara midye, kıllı midye, kidonya, kum şırlanı ve kum midyesi olmak üzere 7 tür olup, bu türler içerisinde etken

en fazla kum şırlanı (% 8.92) ve istiridye numunelerinden (% 8.65) izole edilmiştir.

Awad ve El Shater (5), Mısır'da iki ayrı şehirdeki marketlerden toplanan 20 istiridye örneğinin % 15'inde etkeni izole ettiklerini, Fang ve ark. (24), Tayvan'da 770 deniz ürününden 352'sinde etkeni izole ettiklerini ve bu ürünlerin içinde çift kabuklu yumuşakçaların % 68.7 izolasyon sıklığı ile ilk sırada yer aldığını, Torres-Vitela ve Fernandez-Escartin (61), Meksika'da istiridyelerde % 44, Franca ve ark. (25), Brezilya'da 36 kabuklu örneğinde % 19.9, Binta ve ark. (13), Kenya'da 214 kabuklu örneğinde % 22.4, Van den Broek ve ark. (63), Hollanda'da 23 midye örneğinde % 26, Berzero ve ark. (11), İtalya'da 284 kabuklu örneğinde % 4.3, Zulkifli ve ark. (68) Endonezya kıyılarından topladıkları 50 kidonya numunesinin 25'inden (% 50), Ripabelli ve ark. (54) 62 kara midye örneğinin 51.6'sından etkeni izole etmişlerdir. Hervio-Heath ve ark. (29) Fransa kıyılarından topladıkları kara midye ve deniz suyu örneklerinden izole ettikleri gram negatif ve oksidaz pozitif 242 izolatın 46 tanesini klasik metotlarla *V. parahaemolyticus* olarak tanımladılar. Zaleski ve ark. (66) tarafından Baltık Denizi'nden avlanan 541 deniz ürünüde etkenin saptanmadığı bildirilmiştir.

Araştırmacılar (7, 18, 27, 30, 56), ılık kıyı sularının mikroflorasında etkenin yaygın olduğunu ve özellikle yaz aylarında insidensinin arttığını bildirmiştir. Bu çalışmada kullanılan numuneler Eylül-Mayıs aylarında alınmıştır. İzolasyon oranının ülkemizde yapılan çalışmalar (2, 6, 35, 60) ve diğer çalışmalardan (5, 13, 25, 54, 63, 68) düşük olması mevsimsel özellikler ile tuzluluk ve suların

hijyenik kalitesi ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Akalın ve Tuna (2), 583 çift kabuklu yumuşakça numunesinden % 11.5, Aydın ve Soyutemiz (6), 70 kum midyesinden % 14.3, Karaçam ve ark. (35) Trabzon sahillerinden toplanan midyelerden aylara göre % 3.-3.7, Terzi ve ark. (60), Samsun Bölgesi'nden alınan kara midyelerden % 40 oranında etkeni izole ettiklerini açıklamışlardır. İnal ve ark. (33) Karadeniz'de yaptıkları çalışmada, Samsun-Sinop arasındaki kıyıda yaz mevsiminde avlanan 53 balık örneğinin 37'sinden (% 69.8) etkeni izole ettiklerini açıklarken, numunelerin yaz aylarında alındığına dikkat çekmişlerdir.

Çaklı ve ark (15), İzmir Körfezindeki farklı istasyonlardan toplanan akindeslerde, Şentürk (58), Karadeniz, Marmara ve Çanakkale Bölgelerinden toplanan kum midyelerinde etkene rastlamadıklarını bildirirken, bu çalışmada da Balıkesir Bölgesinden alınan 58 adet kum midyesi numunesinden *V. parahaemolyticus* izole edilmemiştir.

Deniz suyu ve ürünlerinden izole edilen suşların genellikle KP⁺ olduğunu bildiren araştırmacıların (1, 11, 24, 34) yanısıra, bazı araştırmacılar farklı sonuçlar bildirmiştir (7, 13, 55). Abdelnoor ve Roumani (1), deniz ürünlerinden izole ettikleri 3 suştan 2'sinin Kanagawa pozitif olduğunu bildirmiştir. Wong ve ark. (64), Tayvan'da gıda kökenli zehirlenmelerden elde edilen 371 izolatın % 92.4'ünün KP⁺ olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada izole edilen 57 adet *V. parahaemolyticus* izolatının 21'i (% 36.8) KP pozitif bulunmuştur. Jhonson ve ark. (34) Amerika'nın Orta Atlantik bölgesinde ortaya çıkan *V. parahaemolyticus*'a bağlı gıda zehirlenmesinden izole ettikleri etkenin Kanagawa negatif, izolasyonu gerçekleştirdikleri zamanı ekim ayı olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bulgularımız bazı araştırmacıların deniz ürünlerinden izole ettikleri suşların KP⁺ olduğu yönündeki bulgularıyla paralellik göstermemektedir (13, 27, 28, 29). İnsanlarda KP⁺ suşların daha patojen olduğu ve yaz ishallerinde etkene daha sık rastlandığı yaygın kanısına rağmen (7, 27, 30, 33, 51, 56, 59), bazı araştırmacılar bu duruma zıt görüşler bildirmişlerdir (34, 50, 67).

İnsanlardaki enfeksiyonlardan KP⁺ suşların yada UH⁺ suşların sorumlu olduğu ya da bu patojen suşların her iki özelliği birden taşıdığı bildirilmektedir (4, 48). Honda ve ark (32), deniz ürünlerinden

elde ettikleri izolatların % 5.7'sinin, klinik vakalardan elde edilen izolatların ise % 11.2'sinin, Osawa ve ark. (50), klinik izolatlardan elde ettikleri 132 suşun % 7.5'nin, Kaysner ve ark. (32), deniz suyu, istiridye ve sedimentte % 71.5 oranında buldukları izolatların % 58.4'ünün, Akalın ve Tuna (2), deniz suyu ve deniz ürünlerinden izole ettikleri 98 izolatın % 8.2'sinin, Terzi ve ark. (60) 32 izolatın % 59'unun, Wong ve ark. (64), klinik vakalardan elde edilen 371 izolatın % 4'ünün UH⁺ olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen 57 izolatın 7'si (% 12.2) UH⁺ bulunmuştur. Bulunan sonuç yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla paralellik gösterirken, Aydın ve Soyutemiz'in (6), bulgularıyla uyumluluk göstermemiştir.

Gerek Türkiye'de gerekse yurt dışında yapılan çalışmalarda çeşitli deniz ürünlerine ait *V. parahaemolyticus*'un izolasyon oranları büyük farklılıklar göstermektedir. Ürünlerin farklı bölgelerden elde edilmiş olmasının ve elde edildikleri alanlardaki su ısısı, tuzluluk ve suların hijyenik kalitesi gibi faktörlerin etkenin bulunma oranı üzerinde etkili olduğu açıklanmıştır (7, 19, 25, 36, 52, 61).

Bu çalışmada etkenin % 4.28 oranda izole edilmesi, Türkiye'de bu ürünleri tüketen insanlar açısından risk olabileceğini göstermektedir. Ayrıca yapılan araştırmalar, etkenin sahip olduğu patojenite genlerinin (*tdh*, *trh*) tüketici sağlığı ile direkt ilişkili olduğunu göstermekte olup, bu nedenle *V. parahaemolyticus* izleme çalışmalarına patojenite ile ilgili çalışmaların da ilave edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Abdelnoor, A.M., Roumani, B.M.** (1980) *Characterization of some Vibrio parahaemolyticus strains isolated from seafoods in Lebanon*. Zbl. Bakteriol. (B), 170 (5-6): 502-507.
2. **Akalın, N., Tuna, İ.** (1999) *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde 1998-1999 yıllarında muayene edilen çift kabuklu yumuşakça ve deniz suyu örneklerinde Vibrio parahaemolyticus izolasyonu*. Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 38: 85-90.
3. **Alam, M.J., Tomochika, K.I., Miyoshi, S.I., Shinoda, S.** (2002) *Environmental investigation of potentially pathogenic Vibrio parahaemolyticus in the Seto-Inland Sea, Japan*. FEMS Microbiol. Lett., 208: 83-87.

4. **Anonim.** (1998) *TS/ISO 8914 Mikrobiyoloji-Vibrio parahaemolyticus aranması için genel kurallar.* Ankara.
5. **Awad, H.A., El Shater, M.A.** (1997) *Microbiological status and the depuration of the Egyptian oysters.* Vet. Med. J. Giza., 45 (3): 337-343.
6. **Aydın, A., Soyutemiz, E.** (2002) *Bazı balık türlerinden ve kum midyelerinden (Venus gallina) Vibrio parahaemolyticus izolasyonu ve identifikasyonu.* Turk. J. Vet. Anim. Sci., 26: 1249-1253.
7. **Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E., Citterio, B.** (2000) *Occurrence and expression of virulence related properties of Vibrio species isolated from widely consumed seafood products.* Int. J. Food Microbiol., 54: 9-18.
8. **Baross, J., Liston, J.** (1970) *Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and related hemolytic Vibrios in marine environments of Washington State.* Appl. Microbiol., 20 (2): 179-186.
9. **Bauer, A., Østensvik, Ø., Florvåg, M., Ørmen, Ø., Rørvik, M.** (2006) *Occurrence of Vibrio parahaemolyticus, V. cholerae, and V. vulnificus in Norwegian blue mussels (Mytilus edulis).* Appl. Environ. Microbiol., 72 (4): 3058-3061.
10. **Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Kaysner, C.A.** (1999) *Detection of total and hemolysin-producing Vibrio parahaemolyticus in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh.* J. Microbiol. Methods, 36: 215-225.
11. **Berzero, R., Crescente, M.D., Zaffalon, C.** (1982) *Vibrio parahaemolyticus in molluscs.* G. Bacteriol. Virol. Immunol., 75 (7-12): 264-272.
12. **Beuchat, L.R.** (1982) *Vibrio parahaemolyticus: Public health significance.* Food Technol., 25: 80-83.
13. **Binta, M.G., Nyaga, P.N.** (1982) *The distribution of Vibrio parahaemolyticus serotypes in Kenyan seafish, shellfish, marine water and sediment.* Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 76 (4): 497-499.
14. **Chan, S.S.W., Nig, K.C., Cheung, T.H., Rainer, T.H.** (2002) *Vibri parahaemolyticus: A leading of infectious diarrhoeain Hong Kong.* Hong Kong J. Emerg. Med., 9 (1): 23-29.
15. **Çaklı, Ş., Hindioğlu, A., Arda, M.** (1997) *İzmir Körfezi'nden farklı istasyonlardan toplanan akivades (Tapes decussatus, L. 1758)'lerin mikrobiyolojik kalite kontrolleri.* Akdeniz Balıkçılık Kongresi, 9-11 Nisan, İzmir.
16. **Daniels, N.A, MacKinnon, L., Bishop, R.** (2000) *Vibrio parahaemolyticus infections in the United States, 1973-1998.* J. Infect. Dis., 181 (5):1661-6.
17. **Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., Baldwin, T., Kingsley, M., Pühr, N., Wells, J.** (2000) *Emergency of a new Vibrio parahaemolyticus serotype in row oysters.* J.A.M.A., 284 (12): 1541-1545.
18. **Deepanjali, A., Sanath Kumar, H., Karunasagar, I., Karunasagar, I.** (2005) *Seasonal variation in abundance of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus bacteria in oysters along the southwest coast of India.* Appl. Environ. Microbiol., 71: 3575-3580.
19. **DePaola, A., Hopkins, L.H., Peeler, J.T., Wentz, B., McPhearson, R.M.** (1990) *Incidence of Vibrio parahaemolyticus in U.S. coastal waters and oysters.* Appl. Environ. Microbiol., 56: 2299-2302.
20. **DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., Cook, D.W.** (2000) *Environmental investigations of Vibrio parahaemolyticus in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998).* Appl. Environ. Microbiol., 66: 4649-4654.
21. **Di-Pinto, A., Ciccacese, G., De Corato, R., Novello, L., Terio, V.** (2008) *Detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in southern Italian shellfish.* Food Control, 19: 1037-1041.
22. **Dileep, V., Kumar, H.S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I.** (2003) *Application of PCR in detection of Vibrio parahaemolyticus in seafoods.* Lett. Appl. Microbiol., 36: 423-427.
23. **Eliot, E.L., Kaysmer, A.C., Tumplin, H.L.** (1992) *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus and other Vibrio spp.* pp:111-140. In: Jackson, G.J. (Eds): Bacterial Analytical Manual. 7th edition, AOAC International Arlengton, VA.
24. **Fang, S.W., Huang, W.W., Chen, L.H.** (1987) *Contamination of seafood by Vibrio parahaemolyticus in Taiwan.* Zhonghua Min Guo. Wei Shenq Wu Ji. Mian. Yi Xue Za Zhi., 20 (2): 140-147.
25. **Franca, S.M., Gibbs, D.L., Samuels, P., Johnson, W.D.** (1980) *Vibrio parahaemolyticus in Brazilian coastal waters.* J. Am. Med. Assoc., 244 (6): 587-588.
26. **Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., Ueho, T.** (1953) *On the bacteriological examination of shellfish food poisoning.* Med. J. Osaka Univ., 4: 299-305.
27. **Ghosh, A.R., Sehgal, S.C.** (1998) *Haemolysin production by environmental isolates of Vibrio parahaemolyticus from andamans.* Indian J. Med. Res., 107: 151-154.
28. **Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., Karunasagar, I.** (2005) *The occurrence of Vibrio species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety.* Int. J. Food Microbiol., 102: 151-159.

29. Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., Pommepuy, M. (2002) Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 1123-1135.
30. Hlady, W.G., Klontz, K.C. (1996) The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.*, 173 (5): 1176-83.
31. Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T. (1988) Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.*, 56: 961-965.
32. Honda, S., Matsumoto, S., Miwatani, T., Honda, T. (1992) A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhoea, seawater and imported frozen seafoods. *Eur. J. Epidemiol.*, 8 (6): 861-864.
33. Inal, T., Yurtyeri, A., Ambarcı, U. (1973) Untersuchungen ber das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* im Jahre 1971 in der Türkei. *Fleischwirtschaft*, 53 (9): 1299-1301.
34. Jhonson, D.E., Weinberg, L., Ciarkowski, J., West, P., Colwell, L.L. (1984) Wound infection caused by Kana-Gawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.*, 20 (4): 811-812.
35. Karaçam, H., Boran, M., Köse, S. (1997). Trabzon sahillerindeki midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) bakteriyel kontaminasyon. Akdeniz Balıkçılık Kongresi. 9-11 Nisan, İzmir.
36. Kaneko, T., Colwell, R.R. (1973) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.*, 113: 24-32.
37. Kaysner, C.A., Abeyta, C. Jr., Stott, R.F., Lilja, J.L., Wekell, M.M. (1990) Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (4): 904-907.
38. Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M. (1999) Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1173-1177.
39. Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. (2003) Risk Profile: *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood. Christchurch Science Centre. Erişim: nzfsagovt.nz/science/risk-profiles. Ocak, 2011
40. Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D. (2005) Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 1319-1320.
41. Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y., Garcia-Martin, O. (2008) Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Rias of Galicia, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 265-274.
42. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5 (5): 607-625.
43. McCarter, L. (1999) The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.*, 1 (1): 51-57.
44. Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S. (1969) In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.*, 100: 1147-1149.
45. Miyoshi, S., Nakazawa, H., Kawata, K., Tomochika, K., Tobe, K., Shinoda, S. (1998) Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect. Immun.*, 66 (10): 4851-4855.
46. Natarajan, R., Abraham, M., Navi, G.B. (1980) Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Porto Novo Environment. *Indian J. Med. Res.*, 71: 679-689.
47. Nishibuchi, M., Kaper, J.B. (1995) Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.*, 63: 2093-2099.
48. Oberhofer, T.R., Podgore, J.K. (1982) Urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 16 (3): 581-583.
49. Olsen, S.J., MacKinnon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H., Slutsker, L. (2000) Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1993-1997. *MMWR CDC Surveill Summ.*, 49 (1): 1-62.
50. Osawa, R., Okitsu, T., Morozumi, H., Yamai, S. (1996) Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (2): 725-727.
51. Osawa, R., Arakawa, E., Okitsu, T., Yamai, S., Watanabe, H. (2002) Levels of thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 and other serovars grown anaerobically with the presence of a bile acid. *Curr. Microbiol.*, 44 (4): 302-305.

52. **Quintoil, M.N., Porten, K., Pramanik, A.K.** (2007) *Studies on occurrence of Vibrio parahaemolyticus in fin fishes and shellfishes from different ecosystem of West Bengal*. Livestock Res. Rur. Dev., 19 (1).
53. **Raghunath, P., Acharya, S., Bhanumathi, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I.** (2008) *Detection and molecular characterization of Vibrio parahaemolyticus isolated from seafood harvested along the southwest coast of India*. Food Microbiol., 25: 824-830.
54. **Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A., Luzzi, I.** (1999) *Occurrence of Vibrio and other pathogenic bacteria in Mytilus galloprovincialis (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy*. Int. J. Food Microbiol., 49 (1-2): 43-48.
55. **Robert-Pillot, A., Gue'nole', A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L.** (2004) *Occurrence of the tdh and trh genes in Vibrio parahaemolyticus isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France*. Int. J. Food Microbiol., 91: 319-325.
56. **Saha, M.R., Sen, D., De, S.P., Sircar, B.K., Sengupta, P.G., Pal, S.C.** (1982) *Kanagawa phenomenon and serotypic pattern of Vibrio parahemolyticus strains isolated from various sources in Calcutta*. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 76 (6): 786-789.
57. **Shinoda, S., Nakahara, N., Ninomiya, Y., Itoh, K., Kane, H.** (1983) *Serological method for identification Vibrio parahaemolyticus from marine samples*. Appl. Environ. Microbiol., 45 (1): 148-152.
58. **Şentürk, A.** (1997) *Kum midyelerinin (Chamelea gallina L.1758) işlenmesi ve mikrobiyolojik kriterlerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniv., Fen Bil. Enst., İstanbul.
59. **Teramoto, T., Nakanishi, H., Maejima, K.** (1969) *Kanagawa reaction of Vibrio parahaemolyticus isolated from food poisoning*. Modern Media, 15: 215.
60. **Terzi, G., Büyüktanır, Ö., Yurdusev, N.** (2009) *Detection of the tdh and trh genes in Vibrio parahaemolyticus isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey*. Lett. Appl. Microbiol., 49: 757-763.
61. **Torres-Vitela, M.R., Fernandez Escartin, E.** (1993) *Incidence of Vibrio parahaemolyticus in raw fish, oysters, and shrimp*. Rev. Latinoamericana. Microbiol., 35 (3): 267-272.
62. **Twedt, R.M.** (1989) *Vibrio parahaemolyticus*. pp: 543-568. In: Doyle, M.P. (Ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
63. **Van den Broek, M.J., Mossel, D.A., Eggenkamp, A.E.** (1979) *Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in Dutch mussels*. Appl. Environ. Microbiol., 37 (3): 438-442.
64. **Wong, H.C., Lui S.H., Ku, L.W., Lee, I.Y., Wang, T.K., Kuo, L.P., Shih, D.Y.** (2000) *Characterization of Vibrio parahaemolyticus isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan*. J. Food Protect., 63 (7): 900-906.
65. **Yang, Z.Q., Jiao, X.A., Zhou, X.H., Cao, G.X., Fang, W.M., Gu, R.X.** (2008) *Isolation and molecular characterization of Vibrio parahaemolyticus from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China*. Int. J. Food Microbiol., 125: 279-285.
66. **Zaleski, S., Daczowska, E., Fik, A., Dzido, E., Gracz, J.** (1975) *Surveys on the occurrence of Vibrio parahaemolyticus on fish caught in the Southern Central Baltic Sea in comparison with other European results*. Zbl. Bakteriologie (B), 161 (3): 288-294.
67. **Zen-Yoji, H., Sakai, S., Kudo, Y., Ito, T., Maruyama, T.** (1970) *Food poisoning due to Kanagawa-negative Vibrio parahaemolyticus*. Media Circle, 15: 82.
68. **Zulkifli, Y., Alitheen, N.B., Son, R., Yeap, S.K., Lesley, M.B., Raha, A.R.** (2009) *Identification of Vibrio parahaemolyticus isolates by PCR targeted to the toxR gene and detection of virulence genes*. Int. J. Food Microbiol. 16: 289-29.

Yazışma Adresi:

Dr. Meriç Lütfi AVSEVER
 Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
 Bakteriyel Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı
 35040 Bornova-İZMİR
 E-mail: lutfiavsever@gmail.com

İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIĞI SAHA VE AŞI VİRUSLARININ ANTİJENİK VE PATOJENİK ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDEN MOLEKÜLER ANALİZİ

MOLECULAR ANALYSIS OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE FIELD AND VACCINE VIRUSES FOR THEIR ANTIGENIC AND PATHOGENIC CHARACTERISTICS

Olca TÜRE GÖKSU¹

Fethiye ÇÖVEN²

Geliş Tarihi (Received): 09.09.2011

Kabul Tarihi (Accepted): 03.11.2011

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye’de infeksiyöz bursal hastalığı (IBD) salgınlarının başladığı 90’lı yılların başından 2010 yılına kadar 3 farklı dönemde (1990-1994; 1998-2003 ve 2010) toplanan 140 saha izolatu, referans infeksiyöz bursal hastalığı virus (IBDV) suşları (STC, SAL, D78, IN, Ev, MD) ve sahada kullanılmakta olan 20 adet canlı IBDV aşısı ile karşılaştırmalı olarak Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (RT/PCR-RFLP) tekniği ile incelendi. Bu analizlerde, IBD viruslarının VP2 geninin 743bp’lik bir bölümü amplifiye edilerek, saha, aşı ve referans virusların antijenik grupları *BstNI(BstOI)* ve *MboI* enzimleri ile, patojenite özellikleri *SspI* enzimi ile araştırıldı.

Türkiye’de kullanılan aşı viruslarının 3, 4a, 4b, 5 ve 6. moleküler gruplarda yer aldığı görüldü. Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction analizinde pozitif reaksiyon veren 72 saha virusunun antijenik gruplandırmasında; 3, 4a ve 6. moleküler gruplarda yer alan izolatlarda tespit edildi, ayrıca yeni 16 farklı moleküler grup gözlemlendi. Saha viruslarının çoğunluğunun 6 ve Yeni 1 moleküler gruplarında toplandığı görüldü. Diğer saha izolatlarda Yeni 2’den –Yeni 16’ya kadar olan moleküler gruplar arasında dağılım gösterdi. Sahada Amerikan tipte antijenik varyant virusların RFLP profiline (Moleküler Grup 1 ve 2) rastlanmadı. Saha virusları arasında *MboI* enzimi ile elde edilen RFLP profili çeşitliliği *BstNI(BstOI)* enzimi ile elde edilene göre daha yüksekti. *SspI* enzimi ile patojenik gruplandırma çalışması sonucunda, incelenen 72 saha izolatının 65 adedinin (% 90.27) çok virulent (vvIBDV), 6 adedinin (% 8.33) klasik virulent yapıda olduğu görüldü. Bir saha izolatu (E40) *SspI* enzimi ile diğerlerinden farklı RFLP oluşturdu.

Anahtar kelimeler: IBDV, saha virusları, RT/PCR-RFLP.

SUMMARY

In this study, 140 field samples that were collected in 3 different periods from the beginning of the 1990’s, when the infectious bursal disease (IBD) outbreaks started in Turkey, until 2010 (1990-1994; 1999-2003 and 2010) were analyzed comparatively with the reference infectious bursal disease virus (IBDV) strains (STC, SAL, D78, IN, Ev, MD) and 20 live IBDV vaccines used in the field by Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (RT/PCR-RFLP) technique. In these analyses, a 743bp fragment of the VP2 gene of IBD viruses were amplified and antigenic grouping of field, vaccine and reference viruses were investigated with *BstNI(BstOI)* and *MboI* enzymes, pathogenic characteristics were examined with *SspI* enzyme.

IBDV vaccines used in Turkey were found to be in molecular groups 3, 4a, 4b, 5 and 6. Antigenic grouping of 72 field viruses that were positive in RT/PCR tests, isolates were detected in molecular groups 3, 4a and 6. Also, 16 new different molecular groups were observed. Most of the field viruses were clustered in molecular groups 6 and New 1. Other field isolates were distributed among New 2 to New 16. No American variant type virus profiles (molecular group 1 and 2) were observed in the field. The RFLP profile diversity obtained with the *MboI* enzyme was greater than the one obtained by *BstNI(BstOI)* enzyme among the wild type field viruses. As a result of pathogenic grouping study with *SspI* enzyme, 65 of the 72 field isolates (90.27 %) were found to be very virulent (vvIBDV), 6 (8.33 %) of them classical virulent in nature. One field isolate (E40) showed a different RFLP than others when analyzed by *SspI* enzyme.

Key words: IBDV, field viruses, RT/PCR-RFLP.

¹ Dr. Veteriner Hekim, İzmir/ Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü.

² Dr. Uzm. Veteriner Hekim, İzmir/ Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı.

GİRİŞ

İnfeksiyöz bursal hastalığı (IBD - Gumboro Hastalığı) 3-6 haftalık yaştaki piliçlerin bursa Fabricius'larında (bF) yangı ile karakterize, immunosupresif, viral, bulaşıcı bir hastalığı olup, etkeni infeksiyöz bursal hastalığı virusudur (11).

1980'li yılların sonunda Belçika ve Hollanda'da başlayarak Avrupa'nın diğer ülkelerine ve dünyanın pek çok ülkesine hızla yayılan ve ülkemizde de büyük sorun olan çok virulent IBDV'nin (vvIBDV) yol açtığı salgınlar yaşanmıştır (5-8, 10, 19, 22, 31, 34). Salgınlar broylerlerde % 30'lara, yumurtacılar da % 80'lere varan yüksek ölümlere neden olarak kanatlı endüstrisini büyük ekonomik zararlara uğratmıştır. Hastalığın akut-klinik seyri yanında subklinik etki göstermesi ve immunosupresyona yol açması, kayıpların boyutlarını arttırmıştır. Çok virulent IBDV'ye Avustralya, Yeni Zelanda ve A.B.D.'de rastlanmadığı bildirilmiştir (11). Günümüzde sahada biyogüvenlik, sanitasyon önlemleri ve aşılamalara dayanan yoğun mücadele, Gumboro hastalığının görülme sıklığı ve şiddetini azaltmıştır.

İnfeksiyöz bursal hastalığı salgınları görülen ülkelerde etken izolasyonu ve identifikasyonu için çeşitli moleküler tekniklerden yararlanılmıştır. Bu çalışmalarda, reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) tekniği IBDV suşlarının VP2 geninin cDNA'sı üzerindeki enzim kesim noktalarının varlığını ortaya koyarak virusların antijenik ve patojenik özelliklerini tahmin etmek amacıyla kullanılmıştır (1, 14-16, 21, 23-29).

RT/PCR-RFLP tekniğinde *BstNI*(*BstOI*) ve *MboI* restriksiyon enzimlerini kullanarak Jackwood ve ark. (14-16), IBDV aşısı viruslarını 6 moleküler gruba ayırmışlardır. Bunlardan moleküler grup 1 ve 2 varyant virusları, grup 3 ve 4 klasik virusları, grup 5 Lukert suşlarını, grup 6 A.B.D dışından olan virusları ve RS593 aşısı suşunu içermektedir (16). Grup 6'da *SspI* enzim analizi sonucu çok virulent oldukları belirlenen viruslar da bulunmaktadır (16). Patojeniteye göre sınıflandırma çalışmalarında Lin ve ark. (19), çok virulent IBD viruslarının *SspI* enzimi kesim noktasına sahip olduk-

larını ve bu özellikleri nedeniyle klasik patojen olanlardan ayrılabildiklerini rapor etmişlerdir. Çok virulent olan virusların çoğunluğu bu enzim ile sınıflandırılmakla beraber, Zierenberg ve ark. (35), çok virulent olmalarına rağmen bazı IBDV'lerin *SspI* enzimi için kesim noktası bulundurmadıklarını ortaya koymuştur.

RT/PCR-RFLP tekniği kullanılarak yirmi iki ülkeye ait 200'den fazla saha suşu ile yapılan moleküler gruplandırma çalışmalarında 38 farklı moleküler gruba rastlanmış ve saha viruslarında aşısı viruslarına göre daha fazla genetik farklılığın olduğu gözlenmiştir (14-16, 21, 29). Özellikle Jackwood ve ark.'nın ABD ve dünyanın pek çok ülkesinden orijin alan saha viruslarıyla yaptıkları çalışmalarda (15, 16), şimdiye kadar tanımlanan moleküler gruplara uymayan pek çok yeni moleküler profilin varlığı saptanmış ve sahadaki çeşitlilik bildirilmiştir. Yakın coğrafyada Meir ve ark.'nın İsrail'de yaptıkları bir çalışmada (21), 2 moleküler gruba (Gr 6 ve yeni bir profil) rastlanmış ve incelenen tüm saha viruslarının vvIBDV olduğu ortaya konmuştur. Mısır'a ait vvIBDV oldukları tespit edilen 10 saha suşu ile yapılan benzer çalışmada Abdel-Alim ve ark. (1), antijenik yönden 3 farklı moleküler profil gözlemişlerdir. Avustralya'ya ait IBD saha virusları ile yapılan bir çalışmada (25), diğer ülkelerin IBDV'lerinden farklı 12 moleküler gruba rastlanmıştır. Çok virulent viruslarda bulunan *SspI* enzimi kesim noktasına Avustralya IBD viruslarında rastlanmadığı, dolayısıyla dünyada etkili olan çok virulent IBD viruslarının bu ülkede bulunmadığı bildirilmiştir (25).

Ülkemiz IBD saha viruslarının izolasyon ve identifikasyon çalışmaları 90'lı yılların başında konvansiyonel metotlarla (6, 8, 9, 30-32) yapılmış, daha sonraki dönemlerde 394bp'lik VP2 geni (33) ve 743bp'lik VP2 geni üzerinde çeşitli araştırmacılar tarafından RE ve RFLP çalışmaları yürütülmüştür (23, 26-29). Türe ve ark. (29), Türkiye'den 2 (OA, OE), Hollanda'dan 1 (HOL) ve Tayvan'dan 2 (PT, IL) IBDV suşunu ABD klasik ve varyant virusları ile karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Bu çalışmada Türkiye'ye ait her iki virusun çok virulent olduğu, klasik antijenik yapıda ve moleküler grup 6'da yer aldığı görülmüştür. Sareyyüpoğlu ve ark. (28)'nin 24 sürüye ait 47 RT/PCR test pozitif virus

ile yaptıkları RFLP çalışması sonucunda 2 farklı moleküler gruba rastlandığı, bu virüslerin çok virulent oldukları rapor edilmiştir. Sareyyüpoğlu ve ark. (27)'nin, ticari broyler ve yumurtacı 56 sürüyü kapsayan çalışmalarında 43 sürü RT/PCR pozitif bulunmuş, bu çalışmada 5 farklı moleküler profile (MP1-MP5) rastlandığı bildirilmiştir. Özbek ve ark. (23)'nin Elazığ çevresinde IBD şüpheli aynı sürüden topladıkları 40 numunenin 743bp'lik VP2 geninin sadece *Mbol* enzimi ile yapılan RFLP çalışmasında genetik çeşitliliğe rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Önceki çalışmalardan farklı olarak yıllar itibarıyla daha kapsamlı planlanan bu çalışmada; Ege, Marmara, Batı Karadeniz ve İç Anadolu bölgelerinde tavukçuluğun yoğun yapıldığı yerlerden toplanan ve ilave olarak hastalık çıkan veya şüpheli olan bölgelerden yakın dönemde toplanan saha numuneleri çalışılmış, referans virüslerle ve aşularla karşılaştırmalı olarak ülkemizin saha IBD virüslerinin 20 yıllık bir süreçte moleküler epidemiyolojisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma sonuçları epidemiyolojik açıdan olduğu kadar gelecekteki mücadele programları açısından önem taşımaktadır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

IBD Saha Virüsleri: Türkiye'de çeşitli coğrafik bölgelerden, IBD salgını geçirmekte olan veya hastalıktan şüpheli ticari broyler ve yumurtacı tip tavukçuluk işletmelerinden toplanan yaklaşık 140 sürüye ait bF örneği incelendi. Saha örneklerinden 60 adedi (E1-E60) IBD salgınlarının şiddetli seyrettiği 1990'lı yılların ilk dönemlerinden (1990-1994), 67 adedi (Y1-Y67) 1999-2003 yıllarında proje çalışması için toplanan numunelerden sağlandı (33). 2010 yılında 13 saha numunesi çalışmaya ilave edildi. Saha materyalleri ticari broyler ve yumurtacı tip tavukçuluk işletmelerinden, klinik hastalık semptomları gösteren sürülerden alındı. Her örnek en az 3-5 adet bF'tan oluşmaktaydı ve her izolat farklı bir kümes veya çiftliği temsil etti. Bursa Fabricius numunelerinin ortak nekropsi bulgusu; ödem, büyüme, hemoraji, eksudat birikimi, bazen but kaslarında ve bezli midede kanamalar şeklindeydi. Numuneler arasında atrofik

bF'lara da rastlandı. Numunelerin hastalık yaş dönemi 12 ile 63 günler arasında ve ölüm oranları % 1-% 50 arasında değişmekteydi. Saha materyalleri coğrafik dağılım olarak Ege, Marmara, Batı Karadeniz ve İç Anadolu bölgelerinde tavukçuluğun yoğun yapıldığı İzmir, Manisa, Afyon, Bursa, Balıkesir, Bandırma, İstanbul, Bolu, Zonguldak, Konya ve Kayseri illeri ve çevresine aitti.

Primerler: IBD virüsünün VP2 geninin 743 bp'lik bölümünü amplifiye eden 18 bp'lik primer çifti; 5-GCCCAGAGTCTACACCAT-3 (OLİGO 1) 5- CCGGATTATGTCTTTGA -3 (OLİGO 2) kullanıldı (14).

Referans Virüsler: Ohio State University, FAHRP, OARDC, Wooster, OH/A.B.D'den Dr. Y. M.Saif'ten sağlanan, Amerikan IBD virüslerinden serotip 1 klasik antijenik grupta yer alan STC, SAL ile serotip 1 varyant Delaware E (Ev), MD, IN suşları ve Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsünden sağlanan Serotip 1 grubu klasik D78 suşu referans olarak kullanıldı.

IBDV Aşı Virüsleri: Türkiye'ye ithal edilerek kullanılmakta olan Tablo 1'de yer alan 20 adet IBDV aşısı RT/PCR-RFLP tekniği ile incelenerek aşı virüslerinin antijenik grupları araştırıldı.

Restriksiyon enzimler: İnfeksiyöz bursal hastalığı virus suşlarının antijenik alt tiplerinin belirlenmesinde *BstOI* (*BstNI* yerine aynı gen dizilişini tanıyıp kesen *BstOI* enzimi)(Promega) ve *Mbol* (Roche) enzimleri, patojenik alt tiplerinin belirlenmesinde *SspI* (Roche) enzimi referans ve saha virüslerinin 743 bp'lik rt/pcr ürünlerinin moleküler karakterizasyonu amacıyla kullanıldı (14-16).

Metot

Viral RNA ekstraksiyonu: Sahadan dondurulmuş formda laboratuvara ulaşan bF örneklerine hacimlerinin 2 misli TNE buffer (10mM Tris HCl (pH 8.0) 100 mM NaCl ve 1 mM EDTA) ilave edilerek doku homojenizatörü (Ultraterrax-DiAx 900, Heidolph) ile homojenize edildi. Referans virüslerin RNA'ları civciv embriyo fibroblast (CEF) hücre kültürü sıvısından ekstrakte edildi. Ekstraksiyondan önce bursal homojenat sıvıları ve hücre kültürü sıvıları 3 kez dondurulup çözdürüldü. Liyofilize aşular 3 ml TNE buffer içinde çözdürüldü ve ekstraksiyon direkt aşı şişesinden

Tablo 1. Türkiye’de Kullanılan Canlı IBDV Aşıları.

Aşı Adı	İthalatçı Firma	Üretici Firma	Patojenite Düzeyi	Serotipi/Antijenik Grubu
Bursine 2	Pfizer	Fort Dodge, USA	İntermediate	Serotip 1/ İstisna Klasik
Bursine Plus	Pfizer	Fort Dodge, USA	İntermediate plus	Serotip 1/ İstisna Klasik
Cevac Bursa L	Ceva Dif	Cevac Phylaxia, Macaristan	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Cevac IBD L	Ceva Dif	Cevac Phylaxia, Macaristan	Hot	Serotip 1 / Klasik
Cevac Transmune IBD	Ceva Dif	Cevac Phylaxia, Macaristan	Hot suş içeren İmmun kompleks aşı	Serotip 1 / Klasik
Bur 706	RTA	Rhone Merieux, Fransa	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Gallivac IBD	RTA	Merial Select, USA	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Gallivac IBD H 2512	RTA	Merial Select, USA	Hot	Serotip 1 / Klasik
Tad Gumboro Vac Forte	Lohmann, Türkiye	Lohmann Animal Health, Almanya	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Bursal Disease Vaccine	Lohmann, Türkiye	Vineland, USA	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Hipragumboro CH 80	Hipra Vet.	Hipra, İspanya	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Hipragumboro GM 97	Hipra Vet.	Hipra, İspanya	Hot	Serotip 1 / Klasik
Iba Vac ST	Güneşli	Fatro-Neuva, İtalya	Hot	Serotip 1 / Klasik
Iba Vac	Güneşli	Fatro-Neuva, İtalya	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Nobilis Gumboro Broiler	İntervet	Intervet Hollanda	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Nobilis Gumboro D78	İntervet	Intervet Hollanda	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Nobilis Gumboro 228E	İntervet	Intervet Hollanda	Hot	Serotip 1 / Klasik
Tabic MB	Polimed	Abic, İsrail	Hot	Serotip 1 / Klasik
Univax BD	Sanita	Schering Plough Animal Health, USA	İntermediate	Serotip 1 / Klasik
Manisa D78*	-	Manisa THAE	İntermediate	Serotip 1 / Klasik

alınan örneklerden yapıldı. (14, 15). Bursal homojenat sıvısı, hücre kültürü sıvısı veya TNE buffer ile süspanse edilmiş aşılarından viral RNA'nın ekstrakte edilmesinde aynı yöntem kullanıldı (14, 15). Virus içeren sıvı eşit hacimdeki chloroform ile iki kez ekstrakte edildikten sonra, sırasıyla % 0.5 ve 1.0 mg/ml final konsantrasyonlardaki sodium dodecyl sulphate ve proteinase K ile muamele edilerek 37°C'de su banyosunda bekletildi. Örnekler eşit hacimdeki acid phenol (pH 4.3) ve sonra chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ile ekstrakte edildi. Viral RNA, 2M sodium acetate ve absolute ethanol ilavesiyle bir gece -20°C'de presipite edildi. Viral RNA +4°C'de, 14.000 rpm hızda, 30 dakika (Heraus Biofuge) santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra pelletler kurutuldu ve 50 µl

% 90'lık dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) ile süspanse edilerek -20°C de saklandı.

RT/PCR Analizi: İnfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının RT/PCR analizinde klasik metot kullanılarak 743 bp'lik VP2 geni amplifiye edildi (17, 29, 33). Kısaca; DMSO içindeki her RNA örneğinden 2µl'lik miktar alınarak 95°C'de 5 dak. denatüre edildi (1) Primer olarak, VP2 geninin 743 bp'lik fragmentini amplifiye eden primer çifti kullanıldı (14). RT reaksiyonu; 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9.0), % 1 Triton X-100, her deoxyribonucleotide triphosphate (dAATP, dTTP, dCTP, dGTP)'tan 200 µM (Promega), 1µM konsantrasyonda primer (IBDV5' ve IBDV3', Tib Molbiol, GmbH), 25 mM MgCl₂, Recombinant Rnasin (RNase inhibitörü, 40U) (Promega), M-

MLV Reverse transcriptase (200U) (Promega) içeren RT reaksiyon karışımı içinde thermal cycler'da (Techne, Genius) 42°C'de 1 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. İkinci aşamada PCR amplifikasyonu, 10X PCR Buffer, 2-4 µM arasında değişen oranlarda MgCl₂, 2.5U Taq DNA polymerase (Promega) ilave edilerek gerçekleştirildi. 80°C de 5 dak., 25°C de 10 dak., 95°C de 2 dak.'lık hot start reaksiyonundan sonra, PCR işlemi toplam 35 siklus olarak; 95°C'de 2 dakika (denatürasyon), 53°C'de 1.5 dakika (primerlerin tutunması), 72°C'de 1 dakika (polimerizasyon) ve ayrıca son siklusu takiben 72°C'de 7 dakikalık polimerizasyon süreleri uygulanarak gerçekleştirildi (14). Amplifikasyon sonucu elde edilen cDNA ürünleri % 1.5'lük agarose (Basica LE, Prona) jelde elektroforez edildi. Ethidium bromide (Sigma) ile boyanan jeldeki pozitif cDNA bantları UV transilluminator'de (ETS Vilbert-Lourmat) gözlemlendi. Hedeflenen PCR ürünü aynı jel üzerinde bulundurulmuş DNA moleküler ağırlık standardı (MA) (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) ile karşılaştırılarak kontrol edildi ve jel fotoğrafları (Vilber Lourmat, Infinity 115) çekildi.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi: Amplifiye edilen 743bp'lik cDNA'ler *BstNI* (*BstOI*), *MboI* ve *SspI* ile enzimatik reaksi-

yon sokularak çeşitli araştırmacılar tarafından uygulanan yöntemlere göre ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda analiz edildi (14-16, 29). Sekiz µl RT/PCR ürününe her bir enzimden 1 µl (tüm enzimlerin konsantrasyonu:10µ/µl), üretici firma tarafından enzimlerin beraberinde sağlanan 10 X Buffer'dan (Promega) 2 µl, acetylated bovine serum albumin'den (BSA) 0.2 µl ve 8.8 µl % 0.1'lik diethyl pyrocarbonate (Sigma) su ilave edildi. *BstOI* enzimi içeren ürün 60°C'de 1 saat, *MboI* ve *SspI* enzimleri içeren ürünler 37°C'de 1 saat su banyosunda inkübe edildi. Enzimlerle kesilmiş olan cDNA ürünleri % 2'lik agarose (Nu Micropor, Prona) jelde elektroforez edildi ve ethidium bromide (Sigma) ile boyama sonucunda bantlar UV transilluminatörde (Vilber Lourmat, Infinity 115) gözlenerek fotoğraflandı.

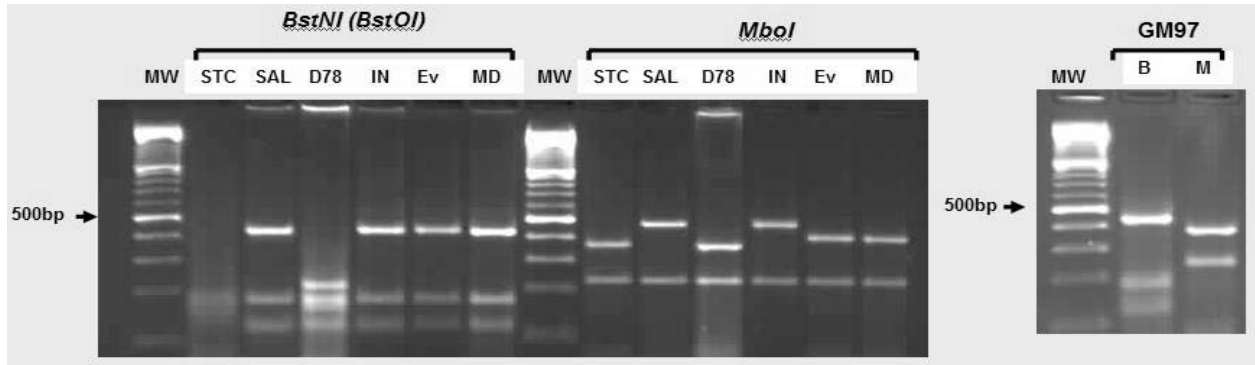
BULGULAR

Referans Virüslerin RFLP Sonuçları: Saha-ya ait IBDV numunelerinin RFLP profilleri ile karşılaştırılması amacıyla klasik STC, SAL, D78, ve variant IN, Ev ve MD suşlarının VP2 geninin 743bp'lik RT/PCR ürünlerinin *BstNI* (*BstOI*) ve *MboI* ile elde edilen RFLP sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Aynı çalışmanın jel fotoğrafı Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2. IBDV Referans Virüslerin Moleküler Grupları ve RFLP Sonuçları.

Antijenik gruplar	Moleküler gruplar	IBDV Referans Suşlar	Restriksiyon enzimler ^a											
			<i>BstNI</i> (<i>BstOI</i>)						<i>MboI</i>					
			424	350	209	172	154	139	119	480	403	362	234	229
Varyant	1	Del A *	■			■			■					
	2	Del E, MD	■			■			■		■			■
Klasik	3	STC				■	■	■	■		■	■		■
	4	D78			■	■	■	■			■	■		■
Karışık	5	SAL, IN	■			■			■	■				■
Klasik (vvIBDV)	6	GM97	■			■			■		■			■

* Jackwood ve ark'nın sonuçlarından yararlanılmıştır.



Şekil 1. IBDV Referans Virusların RFLP Sonuçları.

MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; Klasik IBD virusları (STC, SAL, D78,) varyant IBD virusları (IN,Ev,MD) ve moleküler grup 6'ya (aşı suşu GM97) ait 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) ile reaksiyonu sonucu oluşan RFLP profilleri.

IBDV Aşı Viruslarının Antijenik Gruplandırma RFLP Sonuçları

İncelenen 20 adet canlı IBDV aşılarının antijenik yönden moleküler grupları Tablo 3'te verilmiştir. Türkiye'de kullanılan aşılardan moleküler gruplar 3, 4a, 4b, 5 ve 6'da yer aldıkları görülmüştür. Her moleküler grubu temsil eden jel fotoğrafları Şekil 2'de sunulmuştur.

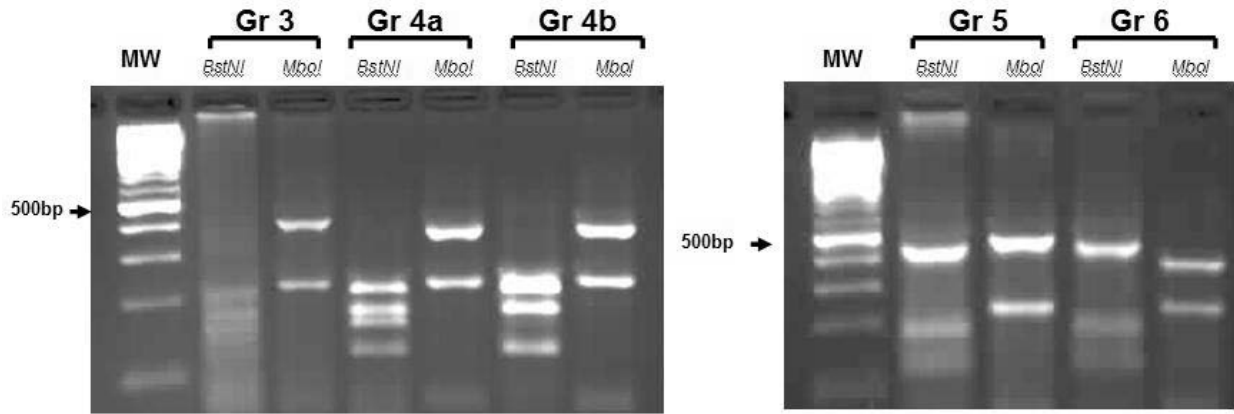
IBD Saha Viruslarının RFLP Sonuçları - Antijenik Gruplandırma

RT/PCR testinde pozitif reaksiyon veren tüm dönemlere (1990-1994, 1999-2003, 2010) ait toplam 72 saha virusunun antijenik gruplandırmasında; 3, 4a ve 6. moleküler gruplarda yer alan saha virusları tespit edildi. Bunların dışında 16 yeni farklı moleküler grup (Yeni 1-Yeni 16) gözlemlendi. Saha viruslarının çoğunluğunun moleküler grup 6 ve Yeni 1 grubunda toplandığı gözlemlendi. Diğer izolatlar Yeni 2'den -Yeni 16'ya kadar olan moleküler gruplar arasında dağılım gösterdi. Sahada Amerikan tipte antijenik varyant virusların RFLP profiline (Moleküler Grup 1 ve 2) rastlanmadı. Saha virusları arasında *MboI* enzimi ile elde edilen RFLP profili çeşitliliği *BstNI(BstOI)* enzimi ile elde edilene göre daha yüksekti. 100bp'in altındaki bantlar dikkate alınmadı. İncelenen tüm saha viruslarında gözlenen ortak moleküler gruplar Tablo 4'te gösterilmiştir. Saha virusları arasında tespit edilen moleküler grupların dağılımı ve RFLP profilleri Tablo 5'te sunulmuştur. 1990-1994 yıllarına ait 14 adet saha virusunun *BstOI* ve *MboI* enzimleri ile reaksiyonlarını gösteren RFLP profilleri sırasıyla Şekil 3 ve Şekil 4'teki jel fotoğraflarında

sunulmuştur. 1999-2003 yıllarına ait saha viruslarının aynı enzimlerle RFLP profilleri Şekil 5 ve Şekil 6'da gösterilmiştir. 2010 yılına ait saha viruslarının jel fotoğrafı Şekil 7'de sunulmuştur. Ayrıca sahada gözlenen tüm moleküler grupları temsilen birer virus seçilerek prototip jel fotoğrafları oluşturulmuştur. Moleküler grupları gösteren jel fotoğrafları Şekil 8-15 arasında sunulmuştur.

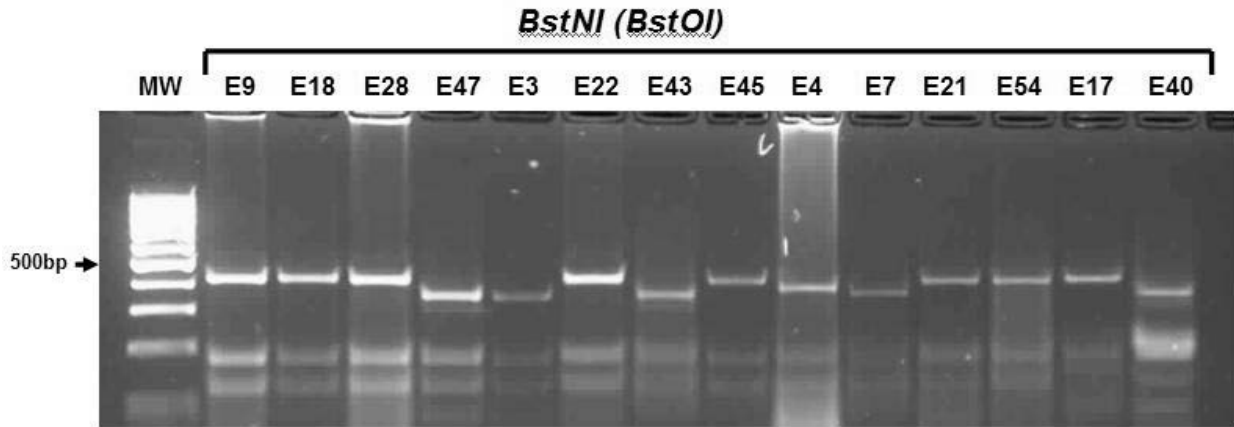
IBD Saha Viruslarının RFLP Sonuçları - Patojenik Gruplandırma

Saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geni *SspI* enzimi ile analiz edildiğinde yüksek oranda virusta 470bp ve 273 bp'lik 2 bant oluştuğu görüldü. *SspI* ile kesilmelerine rağmen bazı numunelerde 743bp'lik bölgede zayıf bir bantın kaldığı gözlemlendi. Test edilen tüm saha viruslarının % 90.27 oranının çok virulent yapıda olduğu bulundu. En yüksek virulans oranı (% 96.3) 1999-2003 dönemine ait viruslarda görüldü. 2010 yılına ait 3 RT/PCR pozitif numune ile yapılan çalışmada sadece 1 virus çok virulent bulundu. E40 kodlu izolat *SspI* enzimi ile diğer tüm viruslardan farklı bir RFLP profili (743bp ve 200bp'in altında 2 bant) oluşturdu. Numunelerin ait olduğu her dönemde iki saha virusunun klasik virulent yapıda olduğu tespit edildi. Klasik virulent gruptaki saha örneklerinden Y67 kodlu izolat moleküler grup 4a benzeri RFLP profili gösterdi. Diğer beş izolat yeni farklı moleküler yapılar sergiledi. Patojenite incelemesinin sonuçları Tablo 6 ve 7'de yer almaktadır. Yıllara göre genel değerlendirme Tablo 8'de sunulmuştur. *SspI* enzimi ile virulens tespit çalışmalarına ait jel fotoğrafları Şekil 16 ve 17'de gösterilmiştir.



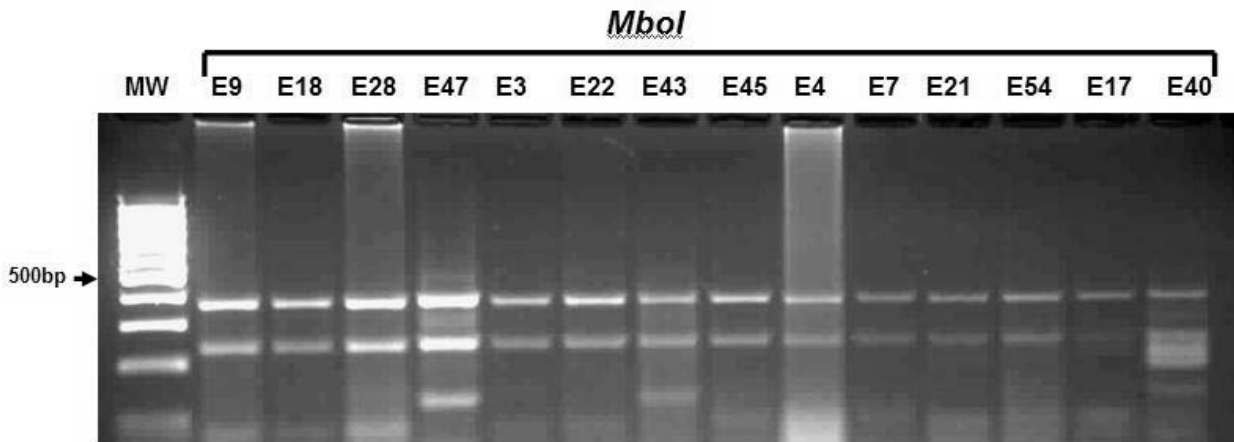
Şekil 2. IBDV Aşı Viruslarının Antijenik Gruplandırma RFLP Sonuçları.

MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; Gr 3 (Gallivac IBD H2512); Gr4a (Nobilis Gumboro D78); Gr 4b (Gallivac IBD); Gr5 (Bursine 2) ve Gr 6 (Nobilis 228 E)'yi temsil eden aşı viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstNI* ve *MboI* restriksiyon enzimleri ile reaksiyonu sonucu gözlenen RFLP profilleri.



Şekil 3. 1990-1994 Dönemi IBDV Saha Viruslarının *BstNI* (*BstOI*) Restriksiyon Enzimi ile RFLP Sonuçları.

MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1990-1994 dönemine ait E Kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstNI* (*BstOI*) restriksiyon enzimi ile gözlenen RFLP profilleri.

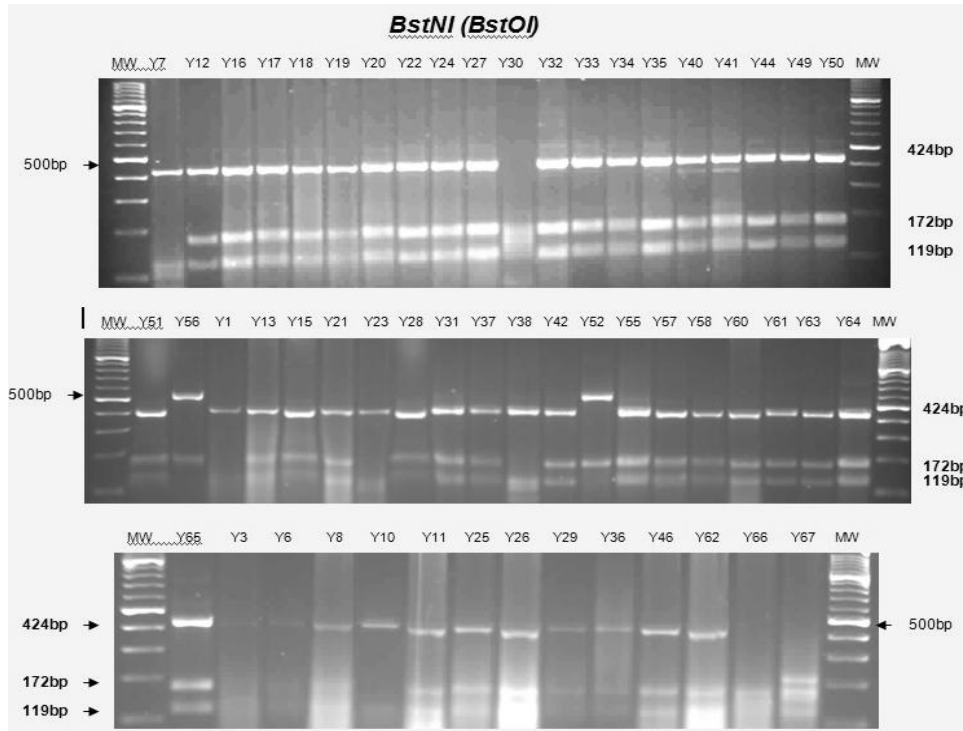


Şekil 4. 1990-1994 Dönemi IBDV Saha Viruslarının *MboI* Restriksiyon Enzimi ile RFLP Sonuçları.

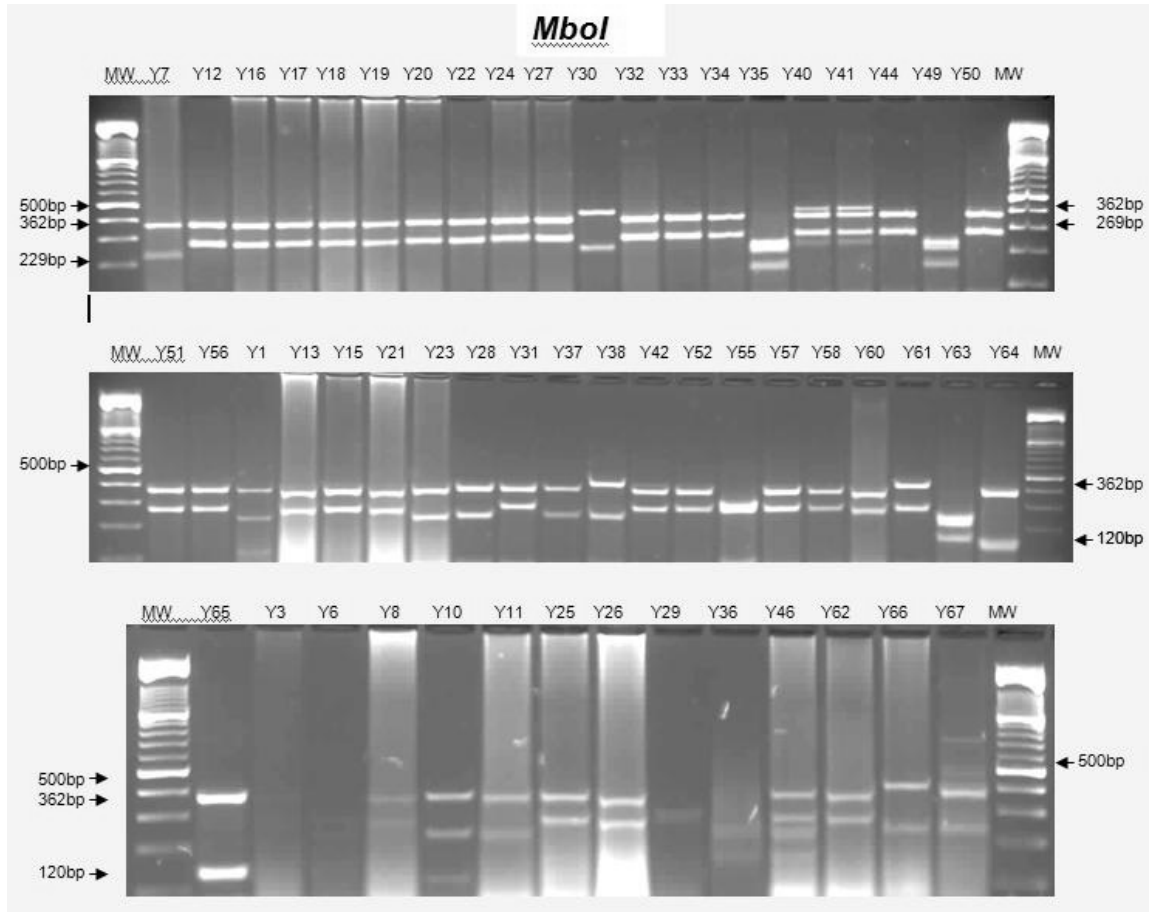
MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1990-1994 dönemine ait E Kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *MboI* restriksiyon enzimi ile gözlenen RFLP profilleri.

Tablo 5. Türkiye’de 1990-2010 Dönemine Ait Saha Virüslerinde Tespit Edilen Moleküler Grupların Dağılımı ve RFLP Profilleri.

Moleküler Grup	Moleküler Gruptaki Saha Virüsü Sayısı	Moleküler Grubun Genel Ortalama İçindeki Oranı	İzolat Kod'u	<i>BstNI</i> (<i>BstOI</i>)	<i>MboI</i>
3	2	%2.7	Y30, Y66	172, 154, 139, 119	403, 229
4a	1	%1.38	Y67	209, 172, 154, 119	362, 229
6	13	%18.05	Y37, E9, E15, E18, E21, E22, E28, E45, E54, E4, Y11, Y28, 2010-4	424, 172, 119	362, 229
Yeni 1	30	%41.66	Y3, Y12, Y13, Y15, Y16, Y17, Y18, Y19, Y20, Y21, Y22, Y24, Y25, Y27, Y31, Y32, Y33, Y34, Y42, Y44, Y50, Y57, Y58, Y60, Y8, Y26, Y51, Y62, 2010-3, 2010-6	424, 172, 119	362, 269
Yeni 2	2	%2.7	Y64, Y65	424, 172, 119	362, 120
Yeni 3	4	%5.55	Y35, Y36, Y49, Y63	424, 172, 119	234, 229, 150
Yeni 4	1	%1.38	Y61	424, 172, 119	403, 269
Yeni 5	2	%2.7	Y29, Y55	424, 172, 119	280
Yeni 6	1	%1.38	Y6	424, 172, 119	280, 229
Yeni 7	1	%1.38	E46	424, 172, 119	362, 234, 229, 150
Yeni 8	1	%1.38	E17	424, 172, 154	362, 269, 229
Yeni 9	2	%2.7	E3, E7	370, 172, 119	362, 229
Yeni 10	2	%2.7	E43, E47	370, 172, 119	362, 229, 112
Yeni 11	2	%2.7	Y7, Y23	424, 119, 110	362, 229
Yeni 12	1	%1.38	Y38	424, 119, 110	403, 229
Yeni 13	2	%2.7	Y1, Y10	424, 119, 110	362, 229, 112
Yeni 14	1	%1.38	E40	370, 209, 172, 119	403, 229, 200, 180, 120
Yeni 15	2	%2.7	Y40, Y41	424, 400, 172, 119	403, 362, 269, 234
Yeni 16	2	%2.7	Y52, Y56	>500, 172	362, 269

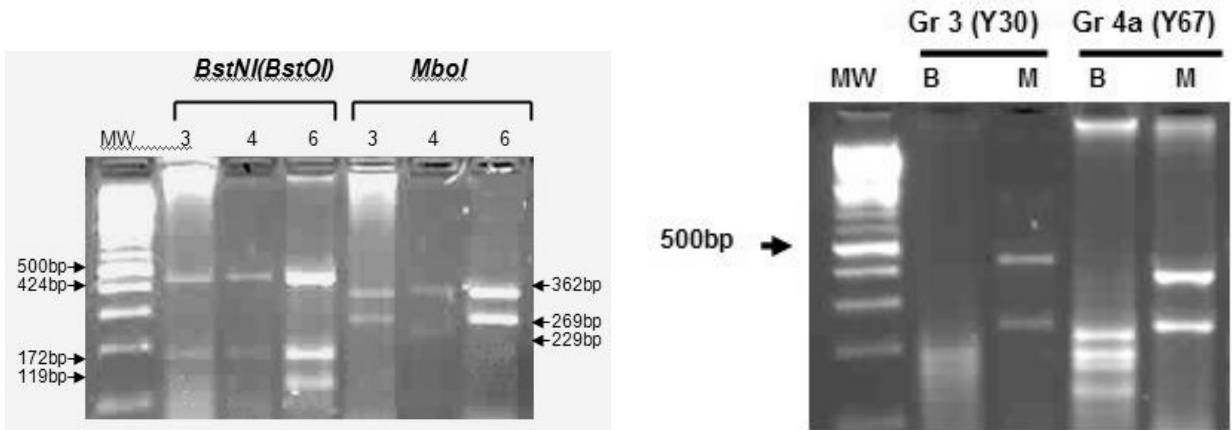


Şekil 5. 1999-2003 Dönemi IBDV Saha Virüslerinin *BstNI* (*BstOI*) Restriksiyon Enzimi ile RFLP Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1999-2003 dönemine ait Y Kodlu saha virüslerinin 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* restriksiyon enzimi ile gözlenen RFLP profilleri.



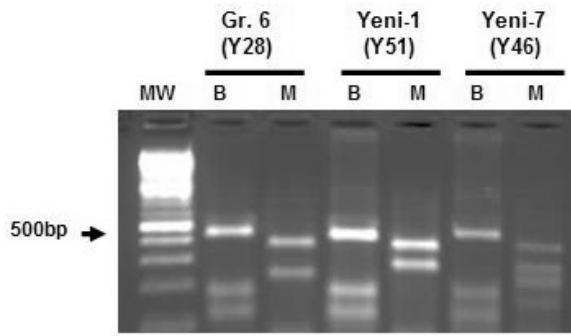
Şekil 6. 1999-2003 Dönemi IBDV Saha Viruslarının *Mbol* Restriksiyon Enzimi ile RFLP Sonuçları.

MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1999-2003 dönemine ait Y Kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *Mbol* restriksiyon enzimi ile gözlenen RFLP profilleri.

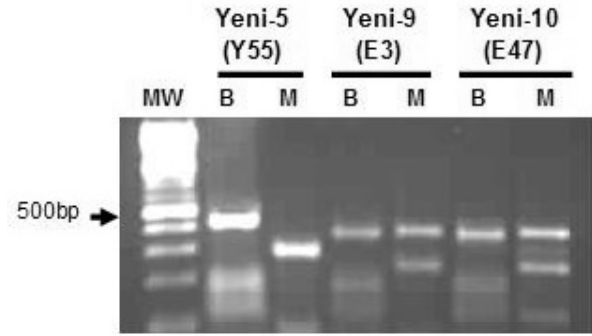


Şekil 7. 2010 Yılına Ait IBDV Saha Viruslarının *BstNI* (*BstOI*) ve *Mbol* Restriksiyon Enzimleri ile RFLP Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 2010 dönemine ait 3, 4, 6 Kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* ve *Mbol* restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.

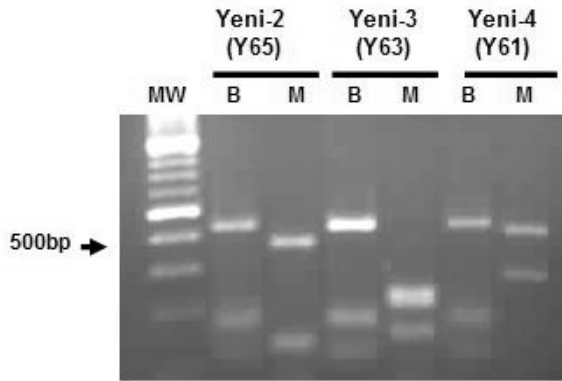
Şekil 8. Saha Viruslarında Moleküler Grup 3 ve 4a RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; Gr 3'ü temsilen Y30 kodlu, Gr 4a'yı temsilen Y67 kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* (B) ve *Mbol* (M) 743bp'lik restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



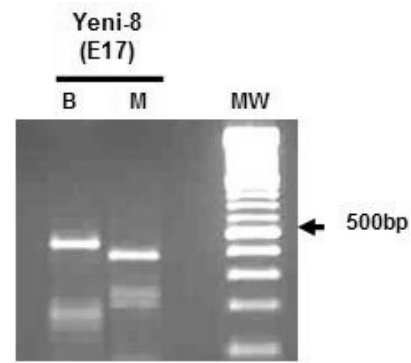
Şekil 9. Saha Viruslarında Moleküler Grup 6, Yeni 1 ve Yeni 7'nin RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; Gr 6'yı temsilen Y28, Yeni-1'i temsilen Y51, Yeni-7'yi temsilen Y46 kodlu saha viruslarının VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



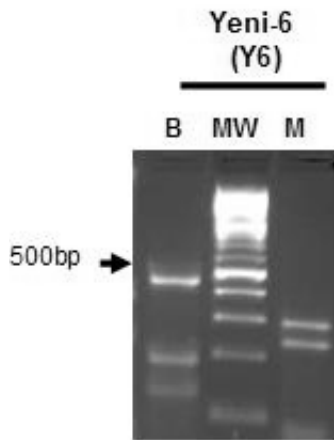
Şekil 12. Saha Viruslarında Moleküler Grup Yeni 5, 9 ve 10'nun RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı, moleküler grup Yeni 5'i temsilen Y55, Yeni 9'u temsilen E3 ve Yeni 10'u temsilen E47 kodlu saha Viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



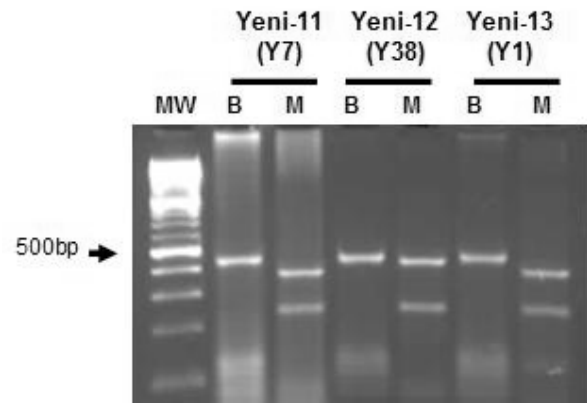
Şekil 10. Saha Viruslarında Moleküler Grup Yeni 2, 3 ve 4'ün RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı, moleküler grup Yeni 2'yi temsilen Y65, Yeni 3'ü temsilen Y63 ve Yeni 4'ü temsilen Y61 kodlu saha Viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



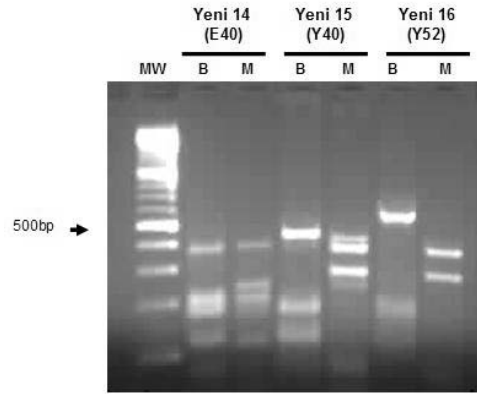
Şekil 13. Saha Viruslarında Moleküler Grup Yeni 8'in RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; moleküler grup Yeni 8'i temsilen E17 kodlu saha virusunun VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



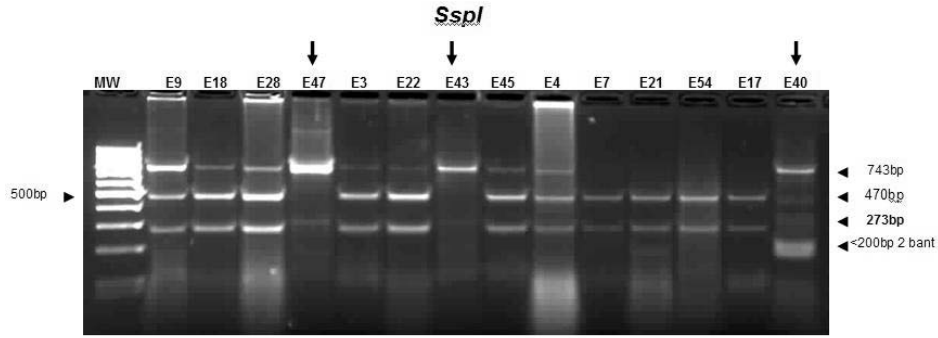
Şekil 11. Saha Viruslarında Moleküler Grup Yeni 6'nın RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; moleküler grup Yeni 6'yı temsilen Y6 kodlu saha virusunun VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



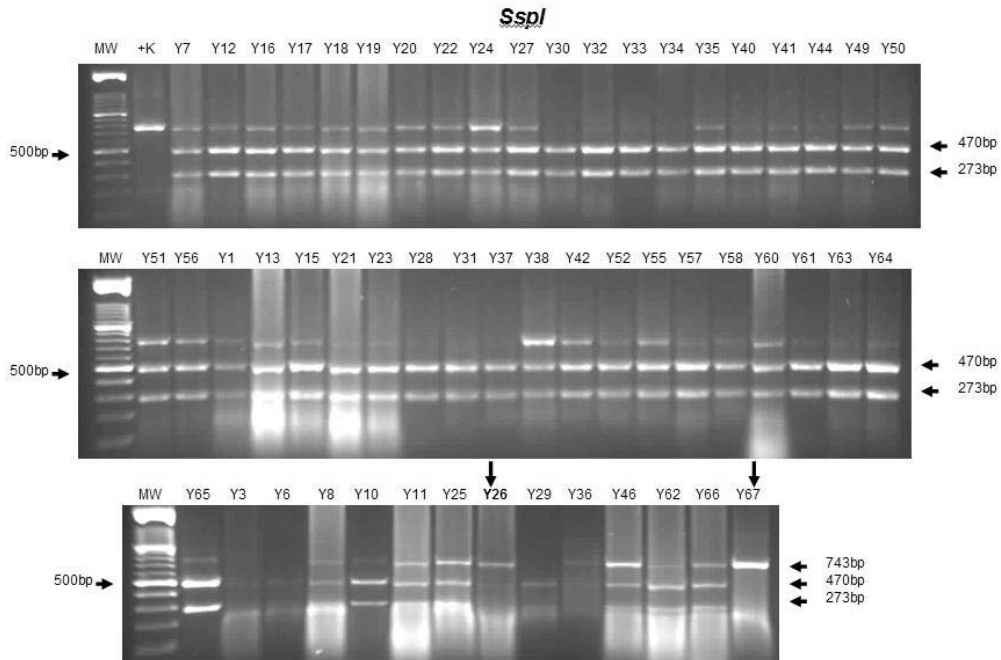
Şekil 14. Saha Viruslarında Moleküler Grup Yeni 11, 12 ve 13'ün RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı, moleküler grup Yeni 11'i temsilen Y7, Yeni 12'yi temsilen Y38 ve Yeni 13'ü temsilen Y1 kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



Şekil 15. Saha Viruslarında Moleküler Grup Yeni 14, 15 ve 16'nın RFLP Profili. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; moleküler grup Yeni 14'ü temsilen E40, Yeni 15'i temsilen Y40, Y16'yı temsilen Y52 kodlu saha viruslarının *BstOI* (B) ve *MboI* (M) restriksiyon enzimleri ile gözlenen RFLP profilleri.



Şekil 16. 1990-1994 Dönemi IBDV Saha Viruslarının *SspI* Restriksiyon Enzimi ile RFLP Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1990-1994 dönemine ait E Kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *SspI* restriksiyon enzimi ile gözlenen RFLP profilleri.



Şekil 17. 1999-2003 Dönemi IBDV Saha Viruslarının *SspI* Restriksiyon Enzimi ile RFLP Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1999-2003 dönemine ait Y Kodlu saha viruslarının 743 bp'lik VP2 geninin *SspI* restriksiyon enzimi ile gözlenen RFLP profilleri.

Tablo 6. 1990-1994 Yılları Arasında IBDV Saha İzolatlarında Patojenite Durumu.

İzolot Kodu	Yöresi	<i>SspI</i>			Patojenite Durumu
		743 bp	470bp	273bp	
E3	Ankara		x	x	vvIBDV
E4	Ankara		x	x	vvIBDV
E7	Beypazarı		x	x	vvIBDV
E9	Bursa		x	x	vvIBDV
E15	İstanbul		x	x	vvIBDV
E17	İstanbul		x	x	vvIBDV
E18	İstanbul		x	x	vvIBDV
E21	İstanbul		x	x	vvIBDV
E22	İstanbul		x	x	vvIBDV
E28	İstanbul		x	x	vvIBDV
E40	İzmir	x	200 bp altında 2 bant		Farklı
E43	Konya	x			Klasik IBDV
E45	Konya		x	x	vvIBDV
E47	Konya	x			Klasik IBDV
E54	Bursa		x	x	vvIBDV

Tablo 7. 1999-2003 ve 2010 Yıllarında IBDV Saha İzolatlarında Patojenite Durumu.

İzolot Kodu	Yöresi	<i>SspI</i>			Patojenite Durumu
		743 bp	470bp	273bp	
Y1	İzmir		x	x	vvIBDV
Y3	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y6	Afyon		x	x	vvIBDV
Y7	Konya		x	x	vvIBDV
Y8	Afyon		x	x	vvIBDV
Y10	İzmir		x	x	vvIBDV
Y11	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y12	Balıkesir		x	x	vvIBDV
Y13	Karapürçek, Sakarya		x	x	vvIBDV
Y15	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y16	Erdek		x	x	vvIBDV
Y17	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y18	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y19	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y20	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y21	Erdek		x	x	vvIBDV
Y22	İzmir		x	x	vvIBDV
Y23	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y24	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y25	Bandırma		x	x	vvIBDV
Y26	Bandırma	x			Klasik IBDV
Y27	Bostandere, Bursa		x	x	vvIBDV
Y28	-		x	x	vvIBDV
Y29	Şile, Ağva		x	x	vvIBDV
Y30	Tuzla		x	x	vvIBDV
Y31	Sakarya		x	x	vvIBDV
Y32	Düzce		x	x	vvIBDV
Y33	Sakarya		x	x	vvIBDV

Tablo 7'nin devamı

İzolot Kodu	Yöresi	<i>SspI</i>			Patojenite Durumu
		743 bp	470bp	273bp	
Y34	İzmir		x	x	vvIBDV
Y35	Bergama		x	x	vvIBDV
Y36	Salihli		x	x	vvIBDV
Y37	Akhisar		x	x	vvIBDV
Y38	Manisa		x	x	vvIBDV
Y40	Turgutlu		x	x	vvIBDV
Y41	İzmir		x	x	vvIBDV
Y42	İzmir		x	x	vvIBDV
Y44	Kayseri		x	x	vvIBDV
Y46	Başakpınar		x	x	vvIBDV
Y49	Güneşli		x	x	vvIBDV
Y50	Zonguldak		x	x	vvIBDV
Y51	Zonguldak		x	x	vvIBDV
Y52	Bolu		x	x	vvIBDV
Y55	Bolu		x	x	vvIBDV
Y56	Bolu		x	x	vvIBDV
Y57	Bolu		x	x	vvIBDV
Y58	Bolu		x	x	vvIBDV
Y60	Bolu		x	x	vvIBDV
Y61	İzmir		x	x	vvIBDV
Y62	Bursa		x	x	vvIBDV
Y63	Salihli		x	x	vvIBDV
Y64	Akhisar		x	x	vvIBDV
Y65	Akhisar		x	x	vvIBDV
Y66	İzmir		x	x	vvIBDV
Y67	İzmir	x	x	x	Klasik IBDV
2010-3	Kaynarca	x			Klasik IBDV
2010-4	Kaynarca		x	x	vvIBDV
2010-6	Bandırma	x			Klasik IBDV

Tablo 8. 1990-2010 Yılları Arasında IBDV Saha İzolatlarında Patojenitenin Genel Değerlendirilmesi.

Saha Viruslarının Ait Oldukları Dönem	RT/PCR Pozitif	vvIBDV	vvIBDV %	Klasik IBDV	Farklı
1990-1994	15	12	% 80	2 (E43, E47)	1 (E40)
1999-2003	54	52	% 96.3	2 (Y26, Y67)	-
2010	3	1	% 33.3	2 (2010-3, 2010-6)	-
Toplam	72	65	% 90.27		1

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfeksiyöz bursal hastalığı virusları mutasyon eğilimleri yüksek olan bir virus grubudur. IBDV'nin VP2 geni üzerinde nötralizan antikorların oluşumundan, serotip ve alt tiplerin ayırımından sorumlu antijen bulunmaktadır (3, 12). VP2 geninin genel olarak nükleik asit sekans dizilişini koru-

duğu, ancak 206-350 aminoasit bölgesinde çok değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (2, 13, 18). Bu değişken bölge üzerindeki nükleik asit değişiklikleri virus suşları arasındaki antijenik ve patojenik farklılıkların temelini oluşturmaktadır (4, 13, 18). Çeşitli araştırmacılar (1, 14-16, 19-21, 23, 25, 27-29) IBDV genomunun belli bölümlerini RT/PCR tekniği ile çoğaltarak, cDNA'yi çeşitli restriksiyon

enzimleri ile kesip, ortaya çıkan gen fragmanlarını elektroforez işlemi ile ayırarak suşlar arası farklılıkları gözlemektedirler. RT/PCR-RFLP tekniği ile *BstNI*(*BstOI*) ve *MboI* restriksiyon enzimlerini kullanarak Jackwood ve ark. (14-16), IBDV aşı viruslarını 6 moleküler gruba ayırmışlardır. Bunlardan moleküler grup 1 ve 2 varyant virusları, grup 3 ve 4 klasik virusları, grup 5 Lukert suşlarını, grup 6 A.B.D dışından olan virusları ve RS593 aşı suşunu içermektedir (16). Grup 6'da *SspI* enzim analizi sonucu çok virulent oldukları belirlenen viruslar da bulunmaktadır (16). Lin ve ark. (19), çok virulent IBD viruslarının *SspI* enzimi kesim noktasına sahip olduklarını ve bu özellikleri nedeniyle klasik patojen olanlardan ayrılabilindiklerini rapor etmişlerdir. Başka çalışmalarda (1, 16, 20, 21, 24, 25, 27-29) da *SspI* enziminden vvIBDV'lerin klasik viruslardan ayırt edilmesinde yararlanılmıştır.

Bu çalışmada toplam 140 numuneden RT/PCR testinde pozitif reaksiyon veren 72 saha virusunun antijenik gruplandırmasında Jackwood ve ark. (14-16)'nın 3, 4a ve 6. moleküler gruplarında yer alan izolatlar tespit edilmiş, ayrıca 16 yeni farklı moleküler grup tespit edilmiştir. Jackwood'un aşı viruslarında tespit ettiği moleküler gruplar 3 ve 4a'da sırasıyla 2 (Y30, Y66) ve 1 izolat (Y67) yer almıştır. Y30 ve Y66 izolatlarının virulans analizinde vvIBDV yapıda oldukları bulunması kayda değerdir. Moleküler grup 4a'da yer aldığı tespit edilen Y67 kod'lu izolat aynı zamanda klasik virulent özellik gösterdiği için aşı suşu olma olasılığı bulunmaktadır. Saha viruslarının çoğunluğunun 6 (% 18.05) ve Yeni 1 (% 41.66) moleküler gruplarında toplandığı gözlenmiştir. Diğer saha izolatları Yeni 2'den -Yeni 16'ya kadar olan moleküler gruplar arasında 1, 2 ve 4 izolat yer alacak şekilde dağılım göstermiştir. Moleküler grup 6 virusları, İstanbul, Ankara, Bursa, Konya, Bandırma, Akhisar ve Kaynarca'daki broyler ve yumurtacı işletmelerden orijin almış, 1992-2010 yıllarına kadar olan dönemi kapsayan numunelerden oluşmaktadır. Sareyyüpoğlu ve ark. (27), Ankara, Bolu, Çankırı, Bursa, Çorum, Adana, Manisa ve Eskişehir'deki 56 sürüden topladıkları materyal ile yürüttükleri benzer çalışmada 5 farklı moleküler grup (MP1-MP5) gözlediklerini rapor etmişlerdir. O çalışmada, moleküler grup 6 profiline analiz edilen numunelerin % 11.6'sında rastlanmışlar ve MP3 olarak kodlamışlardır (27). Türe ve

ark. (29)'nın Türkiye'ye ait saha viruslarıyla 1998 yılında yayınladıkları çalışmada OA ve OE suşlarının da 6. moleküler grupta yer aldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada saha izolatlarının % 41.66'sında tespit edilen Yeni 1 grubunda, 1999-2010 yılları arasına rastlayan dönemde çoğunluğu broylerden orijin alan Bandırma, Erdek, Balıkesir, Sakarya, Düzce, İzmir, Kayseri, Afyon'a ait numuneler yer almaktadır. Sareyyüpoğlu ve ark. (27), MP1 olarak isimlendirdikleri aynı moleküler profil grubunda Çorum hariç tüm bölgelerden numunelere rastlanmışlar ve izolatlarının % 60.5'inin bu grupta yer aldığını saptamışlardır. Sareyyüpoğlu ve ark. (27)'nin MP2 (%4.7) olarak isimlendirdikleri moleküler gruba bu çalışmada İzmir'den bir numunede (Yeni 4/Y61) rastlanmış, bu profil Jackwood ve ark.(15)'nin Teksas eyaletindeki ticari sürülerde rastladıkları yeni bir profil ile de benzer bulunmuştur. Ayrıca, Afyon'dan izole edilen Yeni 6 grubunda yer alan Y6 kodlu virus Alabama eyaletinde, Yeni 9 grubunda yer alan Ankara ve Beypazarı'ndan orijin alan 2 virus (E3, E7) Georgia eyaletinde Jackwood ve ark. (15)'nin tespit ettikleri moleküler profillere benzer bulunmuştur. Sareyyüpoğlu ve ark.(27)'nin numunelerin % 18.6 gibi yüksek oranında rastladıkları MP4 profili, Jackwood ve ark (15)'nin 4a aşı profili benzeri moleküler grup olup, bu çalışmada sadece Y67 kod'lu bir numunede rastlanmıştır. Referans viruslarla karşılaştırmalı yürütülen bu çalışmada sahada Amerikan tipte antijenik varyant virusların RFLP profiline (Moleküler Grup 1 ve 2) rastlanmamıştır. Saha virusları arasında *MboI* enzimi ile elde edilen RFLP profili çeşitliliğinin *BstNI*(*BstOI*) enzimi ile elde edilene göre daha yüksek olduğu görülmüştür. *BstOI* ile 10, *MboI* ile 13 farklı profil gözlenmiştir. Sahada gözlenen yeni profiller arasında sekiz adedi (Gr 6, Yeni 1-Yeni7) *BstNI* ile tespit edilen Yeni 424'ler olarak sınıflandırılan gruba girmektedir. Aynı virusların *MboI* ile analizleri sonucu 8 farklı profil gözlenmektedir. Yeni 8-Yeni 16 arasındaki gruplarda ise hem *BstNI* (*BstOI*), hem de *MboI* ile elde edilen profillerde genetik heterojenite yüksek orandadır. Özbey ve ark.(23)'nin Elazığ çevresinde 40 numunenin 743bp'lik VP2 geninin sadece *MboI* enzimi kullanılarak yapılan RFLP çalışmasında genetik heterojenite saptanmaması numunelerin IBD şüpheli aynı sürüden gelmelerinden kaynaklanmaktadır. Diğer araştırmacıların (14-16, 25) *MboI* ile sonuçları, bu çalışmadaki genetik çeşitliliği desteklemektedir.

SspI enzimi ile patojenik gruplandırma çalışması sonucunda, incelenen 72 saha izolatının 65 adedinin (% 90.27) çok virulent yapıda (vvIBDV) olduğu görülmüştür. Test edilen saha viruslarında bu oranların yıllara göre dağılımı 1990-1994'te % 80, 1999-2003'te % 96.3 ve 2010 yılında % 33'tür. Az sayıda numune ile çalışılmış olsa dahi, 2010 yılında saptanan % 33'lük vvIBDV oranı hastalığın şiddetinin azalması ile paralel bir bulgudur. Saha numunelerinin bu çalışma ile benzer dönemlerde toplandığı düşünülen Sareyyüpoğlu ve ark (27)'nin çalışmasında 43 sürünün 29'unda (% 67.4) çok virulentlik saptanması, numunelerin % 18.6 gibi yüksek oranında aynı zamanda aşı profili olan MP4 (moleküler grup 4) profilinin gözlenmesi nedeniyle olabilir. Bu moleküler grupta klasik virulent özellikte viruslar yer almaktadır. Zierenberg ve ark. (35), çok virulent olmalarına rağmen bazı IBDV'lerin (88180 ve HK406) *SspI* enzimi için kesim noktası bulundurmadıklarını bildirmiştir. Bu çalışmada yer alan virusların çoğunluğu için *SspI* enzimi virulens belirlemede genetik bir marker olarak işlev görürken, E43, E47, Y26, Y67, 2010-3 ve 2010-6 kodlu numuneler klasik virulent grupta sınıflandırılmışlardır. Antijenik gruplandırmada Y67 kodlu izolat moleküler grup 4a benzeri RFLP profili gösterdiğinden, bu izolatın aşı virusu olabileceği düşünülmektedir. Diğer beş izolat yeni moleküler yapılar sergilediklerinden, bu virusların Zierenberg ve ark. (35)'nin araştırmasında olduğu gibi çok virulent oldukları halde *SspI* için kesim noktası içermeyen viruslar olabilirler, o nedenle bu durumun *in vivo* çalışma ile teyit edilmesi gerekir. Kayda değer olarak E40 kodlu izolat *SspI* enzimi ile diğer tüm viruslardan farklı bir RFLP profili (743bp ve 200bp'in altında 2 bant) sergilemiştir. Yeni 14 moleküler grubunda tek olarak bulunan, hastalığın erken dönemi olan 1991 yılına ait yumurtacı bir sürüden orijin alan E40 kodlu izolatın *BstNI* (370, 209, 172, 119) ve *MboI* (362, 229, 200, 180, 120) enzim analiz sonuçları da çok fragmanlı özgün bir yapı göstermektedir. Bu suşun antijenik ve patojenik özelliklerinin *in vivo* çalışmalarla ve sekans analizi ile desteklenmesi gerekir.

Sahadaki durumu anlamak amacıyla karşılaştırmalı olarak bu çalışmaya dahil edilen 20 canlı Gumboro aşı virusunun RT/PCR RFLP analizleri sonucunda Türkiye'deki aşuların Jackwood ve ark.

(14-16)'nın bildirdiği 3, 4a, 4b, 5 ve 6. moleküler gruplarda yer aldıkları saptanmıştır. Bu aşuların büyük çoğunluğu daha önce Jackwood ve ark. (14-16) ve diğer araştırmacılar (21, 29) tarafından test edilmiş ve sonuçları raporlanmıştır. Bir kaç aşının (Cevac Bursa L, Iba Vac, Hipragumboro CH/80, Hipragumboro GM97) moleküler grubuna literatürlerde rastlanmamıştır. Jackwood ve ark. (14-16)'nın çalışmalarından kayda değer farklılık olarak moleküler grup 4'te rapor edilen Nobilis Gumboro 228E aşı suşu bu çalışmada moleküler grup 6 profili göstermiştir. Aynı ürünün farklı yıllarda ithal edilen farklı serilerinde yapılan tekrar çalışmalarında da aynı sonuç elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada RT/PCR-RFLP testi sahada enfeksiyona neden olan IBDV viruslarının VP geninin 743bp'lik bölümünde aşı viruslarına göre çok fazla heterojenite belirlemiştir. Sahada var olan moleküler çeşitlilik karşısında mevcut aşuların tüm bu farklı saha suşlarına karşı iyi koruma sağlayıp sağlamadığı kuşku yaratmaktadır. Ancak, diğer yandan sahadaki moleküler profillerdeki farklılıklar her zaman virusların biyolojik özelliklerine yansımayaabileceğinden, elde edilen moleküler farklılıkların biyolojik olarak ne anlam ifade ettiğinin *in vivo* (kros-koruma) veya *in vitro* (virus nötralizasyon testi) çalışmalarla ortaya konması gerekir. Moleküler profilleri temsil eden virusların sekans analizleri yapılarak suşların filogenetik ilişkilerinin ortaya konması gerekir.

Yürütülen bu çalışma ülkenin farklı dönemlere ait IBD viruslarını karakterize etmesi ve kanatlı sektörüne söz konusu hastalıkla ilgili ışık tutması açısından önemlidir. IBD virusu genomunun kolay mutasyona uğrama eğilimi göz önünde bulundurulursa, bu tür taramaların zaman zaman tekrarlanarak yapılmasında yarar vardır.

KAYNAKLAR

1. Abdel-Alim, G., Awaad, M.H., Saif, Y.M. (2003) *Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus*. Avian Dis., 47 (4): 1452-1457.
2. Bayliss, C.D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R.W., Papageorgiou, A., Müller, H., Boursnel, M.E.G. (1990) *Comparisons of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2*. J. Gen. Virol., 71:1303-1312.

3. **Becht, H., Müller, H., Müller, H.K.** (1988) *Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus.* J. Gen. Virol., 69: 631-640.
4. **Brown, M.D., Gren, P., Skinner, M.A.** (1994) *Comparison of "very virulent" with "classical virulent" IBDV to identify virulence determinants.* pp:83-92. Proc. Intern. Symp. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia, Rausholzhausen, Germany.
5. **Chettle, N.J., Stuart, J.C., Wyeth, P.J.** (1989) *Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia.* Vet. Rec., 125: 271-272.
6. **Çöven, F.** (1995) *Broyler ve yumurtacı tavuklarda Gumboro Hastalığının insidensi ve virus izolasyonu.* Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doktora tezi.
7. **Defabio, J., Rossini, L., Eterradossi, N., Toquin, D., Gadrin, Y.** (1999) *European like pathogenic infectious bursal disease virus in Brazil.* Vet. Rec., 145: 203-204.
8. **Ergün, A.** (1995) *Klinik ve subklinik gumboro vakalarından virus izolasyonu ve serotiplendirilmesi.* Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doktora Tezi.
9. **Eterradossi, N.** (2003) *Antigenic and genomic characterization of Turkish isolates of infectious bursal disease.* OIE, AFSSA, Report No: 020652.
10. **Eterradossi, N., Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Bennejean, G.** (1992) *Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks.* Zentralbl. Veterinarmed. B., 39 (9): 683-691.
11. **Eterradossi, N., Saif, Y.M.** (2008) *Infectious bursal disease.* 185-211. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan L.K., Swayne, D.E. (Eds): *Diseases of Poultry*, 12th ed., Blackwell Publishing Company, Iowa State Press, USA.
12. **Fahey, K.J., Erny, K.M., Crooks, J.** (1989) *A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that passively protects chickens.* J. Gen. Virol., 70:1473-1481.
13. **Heine, H.G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K., Azad, A.A.** (1991) *Sequence analysis of expression and the host specific immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standart type I strains.* J. Gen. Virol., 72: 1835-1843.
14. **Jackwood, D.J., Sommer, S.E.** (1997) *Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses.* Avian Dis., 41: 627-637.
15. **Jackwood, D.J., Sommer, S.E.** (1998) *Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens.* Avian Dis., 42: 321-339.
16. **Jackwood, D.J., Sommer, S.E.** (1999) *Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States.* Avian Dis., 43: 310-314.
17. **Jackwood, D.J., Jackwood, R.J.** (1994) *Infectious bursal disease viruses: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses.* Avian Dis., 38: 531-537.
18. **Lana, D.P., Beisel, C.E., Silva, R.F.** (1992) *Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of naturally occurring variant virus.* Virus Genes, 3: 247-259.
19. **Lin, Z., Kato, A., Otaki, Y., Nakamura, T., Sasmaz, E., Ueda, S.** (1993) *Sequence comparisons of highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan.* Avian Dis., 37: 315-323.
20. **Lone, N.A., Rehmani, S.F., Kazmi, S.U., Muzaffar, R., Khan, A., Khan, S.A., Ahmed, A.** (2009) *Molecular characterization of Pakistani field isolates of infectious bursal disease virus.* Avian Dis., 53 (2): 306-309.
21. **Meir, R., Jackwood, D.J., Weisman, Y.** (2001) *Molecular typing of infectious bursal disease virus of Israeli field and vaccine strains by reverse transcription/polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay.* Avian Dis., 45 (1): 223-228.
22. **Nunoya, T., Otaki, Y., Tajima, M., Hiraga, M., Saito, T.** (1992) *Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific pathogen free chickens.* Avian Dis., 36: 597-609.
23. **Özbey, G., Ertas, H.B., Muz, A.** (2003) *Restriction fragment length polymorphism analysis of isolates of infectious bursal disease viruses from Turkey.* Vet. Med.-Czech., 48 (12): 359-362.
24. **Remorini, P., Calderon, M.G., Aguirre, S., Periole, O., La Torre, J., Mattion, N.** (2006) *Characterization of infectious bursal disease viruses from Argentina.* Avian Dis., 50 (2): 245-251.
25. **Sapats, I.S., Ignjatovic, J.** (2002) *Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strain of infectious bursal disease virus.* Avian Pathol., 31: 559-566.
26. **Sareyyüpoğlu, B.** (2005) *Recent research and developments in the molecular diagnosis and characterization of infectious bursal disease virus isolates/strains.* Proceed. of the 14th WVPC, 22-26 August, 2005, İstanbul, Turkey.

27. **Sareyyüpoğlu, B., Akan, M.** (2006). *Restriction fragment length polymorphism typing of infectious bursal disease virus field strains in Turkey*. Avian Dis., 50 (4): 545-549.
28. **Sareyyüpoğlu, B., İzgür, M.** (2006) *Türkiye’de saptanan infeksiyöz bursal hastalık virus suşlarının RFLP ile tiplendirilmesi*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 53: 129-136.
29. **Türe, O., Saif, Y.M., Jackwood, D.J.** (1998) *Restriction fragment length polymorphism analysis of highly virulent strains of infectious bursal disease viruses from Holland, Turkey and Taiwan*. Avian Dis., 42: 470-479.
30. **Türe, O., Çöven, F.** (1999) *SDS-PAGE ve Western immunoblotting teknikleri kullanarak Türkiye’de izole edilen çok virulent infeksiyöz bursal hastalığı viruslarının karşılaştırmalı analizi*. Turk J. Vet. Anim. Sci., 23: 83-92.
31. **Türe, O., Çöven, F.** (1999) *Türkiye’deki infeksiyöz bursal hastalığı salgınlarından çok virulent virusların izolasyonu ve serotiplendirilmesi*. Turk J. Vet. Anim. Sci., 23: 243-254.
32. **Türe, O., Çöven, F., İçin, S.** (1999) *Türkiye’de çeşitli bölgelerden izole edilen çok virulent infeksiyöz bursal hastalığı viruslarının antijenik benzerlikleri*. Turk J. Vet. Anim. Sci., 23: 69-76.
33. **Türe Göksu, O., Erturun, H., Pala, H.H.** (2007) *Türkiye’de izole edilen infeksiyöz bursal hastalığı viruslarının moleküler karakterizasyonu*. Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 29 (43): 5-16.
34. **Van Den Berg, T.P., Gonze, M., Muelemans, G.** (1991) *Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of highly virulent strain*. Avian Pathol., 20: 133-143.
35. **Zierenberg, K., Nieper, H., Van den Berg, T.P., Ezeokoli, C.D., Voss, M., Müler, H.** (2000) *The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus; comparison with very virulent “classical” virulent and attenuated tissue culture adapted strains*. Arch. Virol., 145: 113-125.

Yazışma Adresi:

Dr. Olcay TÜRE GÖKSU
Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü
35040, Bornova-İZMİR
E-mail: olcaytg@gmail.com

THE INVESTIGATION OF *TDH* AND *TRH* GENES OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES FROM BIVALVE MOLLUSCS WITH MULTIPLEX POLIMERASE CHAIN REACTION

ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARDAN İZOLE EDİLEN *VİBRİO PARAHAEMOLYTICUS* İZOLATLARININ *TDH* VE *TRH* GENLERİNİN MULTİPLEX POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Necla TÜRK¹

Meriç Lütfi AVSEVER²

Cemal ÜN³

Geliş Tarihi (Received): 07.09.2011

Kabul Tarihi (Accepted): 29.10.2011

SUMMARY

In this work, 34 *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from bivalve molluscs (wedge shell-*Donax trunculus*, L. 1758, oyster-*Ostrea edulis*, L. 1758, cockle-*Venus verrucosa*, L. 1758, clam-*Tapes decussatus*, L. 1758, bearded mussel-*Modiolus barbatus*, L. 1758, Mediterranean mussel- *Mytilus galloprovincialis* L. 1819, venus-*Chamelea gallina* L., 1753) production stations were used. All of the 34 *V. parahaemolyticus* isolates identified according to TSE/ISO 8914 were found to be negative for *tdh* (thermostable direct haemolysin gene) and *trh* (thermostable related haemolysin gene) genes and positive for a specific gene region for *V. parahaemolyticus* (R72H) after application of multiplex PCR (mPCR) method. In addition, all of the 34 isolates obtained were urea negative and 2 isolates were Kanagawa Phenomenon positive.

Key words: Bivalve molluscs, thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene, thermostable related haemolysin (*trh*) gene, *Vibrio parahaemolyticus*.

ÖZET

Bu çalışmada, üretim istasyonlarındaki çift kabuklu yumuşakçalardan (kum şırlanı-*Donax trunculus*, L. 1758; yassı istiridyeye-*Ostrea edulis*, L. 1758; kidonuya-*Venus verrucosa*, L. 1758; akitades- *Tapes decussatus*, L. 1758; kılılı midye- *Modiolus barbatus*, L. 1758; kara midye- *Mytilus galloprovincialis*, L. 1819; kum midyesi- *Chamelea gallina* L., 1753) izole edilen 34 *Vibrio parahaemolyticus* izolatu kullanıldı. TSE/ISO 8914'e göre *V. parahaemolyticus* olarak tanımlanan 34 izolatin tamamının *tdh* ve *trh* genleri yönünden negatif olduğu, *V. parahaemolyticus*'a spesifik gen bölgesi (R72H) yönünden ise pozitif olduğu bulundu. Ayrıca, 34 izolatin üre hidrolizi negatif bulunurken, 2 izolatin Kanagawa Fenomeni pozitif bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Çift kabuklu yumuşakça, ısıya dirençli direkt hemoliz geni (*tdh*), ısıya dirençli hemoliz ile ilişkili gen (*trh*), *Vibrio parahaemolyticus*.

INTRODUCTION

Vibrio parahaemolyticus, one of the most important bacterial pathogens that infect humans, are widespread in warm water coast microflora (1, 4, 15, 21, 38, 46, 53). Bivalve molluscs can be contaminated with *V. parahaemolyticus* in sea

environment or during transport, processing and marketing. Because of lack of motion and feeding by filtering sea water, these animals can be contaminated with more bacteria and consuming them raw can lead to food poisoning in humans (4, 9, 21, 56).

¹ DVM, Bornova Veterinary Control Institute, Izmir, TURKEY.

² DVM, PhD, Bornova Veterinary Control Institute, Izmir, TURKEY.

³ Assoc. Profesör, Ege University, Faculty of Science, Department of Biology, Bornova, Izmir, TURKEY.

V. parahaemolyticus was first identified in Japan (26) from humans with acute gastroenteritis, who consume sea products. These halophilic and mesophilic aerobic bacteria are resistant to cold conditions, so they can stay alive long term in chilled or frozen products (10, 22, 23, 30, 54).

Consumption of products contaminated with *V. parahaemolyticus* can cause acute gastroenteritis in humans. The bacteria possesses “O” and “K” antigens which are thermostable and H antigen that is flagellar. It is divided into 57 serotypes for “K” antigen and 11 serotypes for “O” antigen (15, 44, 49, 55). In the beginning, some serotypes of the bacteria were considered pathogenic for humans (34, 48, 49). But contemporary researches (18, 23, 40, 59) showed that some haemolytic (enteropathenic) strains are more significant in pathogenicity as they possess the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene and/or thermostable related haemolysin (*trh*) gene and these genes are responsible for pathogenicity in humans. In addition, researchers showed that *trh* positive strains generally hydrolyse urea (UH) and are Kanagawa Phenomenon (KP) positive (15, 37, 40, 52). *V. parahaemolyticus*' haemolytic characteristic is seen in Wagatsuma Agar with β -haemolysis (Kanagawa-Phenomenon) (3, 37, 40, 41, 43).

The investigations (16, 24, 25, 33, 53) showed that isolation frequencies of *V. parahaemolyticus* from aquaculture products were 1.4 %, 45.7 %, 4.68 %, 29.3 %, 71.4 % respectively. In studies with bivalve molluscs (15, 17, 25, 29, 46, 53, 56), isolation frequencies of the bacteria were 26 %, 4.3 %, 19.9 %, 25 %, 12 %, 44 % and 15 % respectively. Despite haemolytic character of *V. parahaemolyticus* strains isolated from aquaculture products were 2 %, this rate, in strains isolated from human faeces, were found to be 93–96.5 % (4, 34, 41, 51, 54).

In Turkey, some investigations have been conducted in bivalve molluscs and fresh or processed marine fish for existence of the bacteria and its pathogenicity genes (2, 12, 19, 33, 35, 50, 52). As well as isolation and identification of the agent with classical methods, presently, molecular techniques are used for confirmation and determination of pathogenic *V. parahaemolyticus*

strains. One of these techniques is multiplex polymerase chain reaction which is a powerful tool for identification of the gene region of the agent (R72H) and *tdh* or *trh* pathogenicity genes (28).

In this study, *V. parahaemolyticus* isolates identified with classical biochemical methods were confirmed and analyzed for the existence of *tdh*, *trh* genes in the isolates. In addition, the agents' haemolytic character in human erythrocytes (Kanagawa Phenomenon) and urea hydrolysis which are related to human pathogenicity were investigated. The aim of this work is to investigate the pathogenicity status of *V. parahaemolyticus* isolates obtained from bivalve molluscs production sites located in Ayvalik, Balıkesir through molecular and some biochemical methods.

MATERIALS AND METHODS

Isolates

V. parahaemolyticus isolates (34 isolates) from bivalve molluscs sent to Bornova Veterinary Control and Research Institute, Fish Diseases National Reference Laboratory, for screening of bivalve molluscs production/ fishing areas (Ayvalik, Balıkesir, northern Aegean Region of Turkey) were used. Samples were taken during the shellfish harvest period between September and May in 2007-2010.

Standart strains

V. parahaemolyticus ATCC 17802 (including R72H identification gene region) and *tdh* +, *trh* + field strains determined by Terzi et al. (52) were used as positive controls; *V. alginolyticus* ATCC 17749 was used as a negative control.

Growth media and solutions

Growth media and solutions in the method described in TS/ISO 8914 (5) and VITEK II GN 32 kits were used.

PCR equipments

Agarose, Ultrapure nuclease-free, pyrogen-free sterile water, orthophosphoric acid (85 %, 1.679 g/mL), orange G or equivalent loading buffer, glycerol, 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ethidium bromide (10 mg/mL), EDTA, *Taq* DNA polymerase (5 units/uL), 50 mM MgCl₂, 10X PCR buffer, minus MgCl₂, Tris

[hydroxymethyl]aminomethane, tris hydrochloride, de-ionized water supply for electrophoresis were used.

Isolation and identification

The isolation and identification of *V. parahaemolyticus* was done as to TS/ISO 8914 standard (5). The isolates identified with biochemical methods also were also confirmed with VITEK II device and then were investigated or the *R72H* gene, *tdh* and *trh* genes of the isolates with mPCR technique (28). In addition, Kanagawa Phenomenon and urea hydrolysis features of the isolates were investigated (3, 37, 40, 41, 42, 43).

Purification of genomic DNA

Bacterial genomic DNA was obtained by using Genomic DNA Purification kit (MBI Fermentas, Germany) and stored at -20 °C until use.

PCR amplifications

PCR assays were performed using primer pairs (5'TGCGAATTCGATAGGGTGT TAACC3') and (5'CGAATCCTTGAACATACGCAGC 3') (39, 47) for VP-32, VP 33; (5'GTAAAGGTCTCT GACTTTTGGAC3') and 5'TGGAATAGAACCCT TCATCTTCACC3') for *tdh* and (5'TTGGCTTC GATATTTTCAGTATCT3') and (CATAACAAA CATATGCCCATTTCC3') (14) for *trh*, according to the procedure described by Green et al. (28). All primers were synthesized by Bio Basic Inc. (Ontario, Canada). Each 25 µl PCR mixture contained ultrapure nuclease-free sterile water (7.22 µl), 10X

PCR buffer (2.50 µl), 50 mM MgCl₂ (1.25 µl), 10 mM dNTPs (dCTP, dATP, dTTP, dGTP) (0.63 µl), 5 µM VP-32 primer (2.50 µl), 5 µM VP-33 primer (2.50 µl), 5 µM TRH-L primer (2.0 µl), 5 µM TRH-R primer (2.0 µl), 5 µM TDH-L primer (1 µl), 5 µM TDH-R primer (1 µl), *Taq* DNA polymerase (5 units/ µl) (0.40 µl) (MBI, Fermentas).

The reactions were performed with an automated thermocycler (Techne, TC-412) as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min., followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec., primer annealing at 58°C for 45 sec., and primer extension at 68°C for 75 sec. A final extension was performed at 68°C for 7 min. PCR products were separated by electrophoresis on 2 % (w/v) agarose gel (1 hour, 75 volt) and visualized under ultraviolet light after ethidium bromide staining. DNA size marker 50 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) was used.

RESULTS

In this study, 34 (5.21 %) *V. parahaemolyticus* was isolated from 652 bivalve molluscs samples taken from bivalve molluscs fishing-production regions for control. Bivalve molluscs species used in this study consisted of oyster, wedge shell, cockle, clam, bearded mussel, Mediterranean mussel and striped venus samples. The highest isolation frequency of *V. parahaemolyticus* was in wedge shell (11.76 %) and oyster (9.93 %) samples. These results are represented (Table 1, 2).

Table 1. Distribution of bivalve molluscs samples (total) and *V. parahaemolyticus* positive samples in years.
Tablo 1. Toplam çift kabuklu yumuşakça örneklerinin ve *V. parahaemolyticus* pozitif örneklerin yıllara göre dağılımı

Species of bivalve molluscs	2007		2008		2009		2010	
	T*	M**	T	M	T	M	T	M
Clam	44	1	48	1	44	3	37	1
Mussel	43	1	14	-	-	-	3	-
Oyster	50	8	50	4	61	4	-	-
Bearded mussel	23	-	24	-	14	1	-	-
Cockle	22	1	24	-	22	2	20	1
Wedge shell	18	1	13	3	13	1	7	1
Striped Venus	-	-	58	-	-	-	-	-
Total	200	12	231	8	154	11	67	3
Distribution of isolation (%)	6		3.46		7.14		4.47	

T*:Total bivalve molluscs samples M** *V. parahaemolyticus* positive bivalve molluscs samples.

Table 2. Distribution of the isolates as to bivalve molluscs species, KP and UH features.
Tablo 2. İzolatların ÇKY türlerine, KP ve UH özelliklerine göre dağılımı.

Species of bivalve molluscs	Number of samples	Number of isolates	%	Kanagawa positive	%	Urea hydrolysis positive	%
Clam	173	6	3.46	0	0	0	0
Mussel	60	1	1.66	0	0	0	0
Oyster	161	16	9.93	1	6.2	0	0
Bearded mussel	61	1	1.63	0	0	0	0
Cockle	88	4	4.54	0	0	0	0
Wedge shell	51	6	11.76	1	16.6	0	0
Striped venus	58	-	-	-	-	-	-
Total	652	34	5.21	2	5.8	0	0

In this study, mPCR method was performed on 34 *V. parahaemolyticus* isolates identified with classical biochemical methods. *R72H* gene region of the isolates was determined in all samples, whereas *tdh* and *trh* gene regions were not. The multiplex PCR, KP and UH results are given in Figures 1-4.

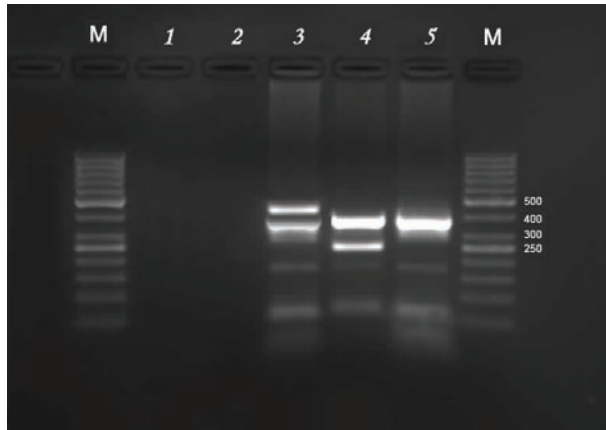


Figure 1. Representative results of mPCR products analysed by agarose gel electrophoresis (optimisation studing). M: 50-bp DNA ladder; Lane 1: negative control (no DNA); Lane 2: negative control (include *V. alginolyticus* ATCC 17749); Lane 3: field isolate determined by Terzi et al. (52), including *R72H* and *trh* gene region, 320, 486 bp; Lane 4: *tdh* positive control (field isolate determined by Terzi et al., including *R72H* and *tdh* gene region), 320, 270 bp; Lane 5: positive control (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802, include only *R72H* gene region), 320 bp.

Şekil 1. mPCR ürünlerinin Jel elektroforez yöntemi ile gösterimi (optimizasyon çalışması). M: 50-bp DNA ladder; No 1: Negatif kontrol (DNA içermeyen); No 2: Negatif kontrol (*V. alginolyticus* ATCC 17749 içeren); No 3: Terzi ve arkadaşlarının (52) çalışmasında tespit edilen, *R72H* ve *trh* gen bölgelerini içeren saha izolatu, 320 ve 486 bp; No 4: Terzi ve arkadaşlarının (52) çalışmasında tespit edilen, *R72H* ve *tdh* gen bölgelerini içeren saha izolatu, 320 ve 270 bp; No 5: Pozitif kontrol (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802, sadece *R72H* gen bölgesini içeren), 320 bp.

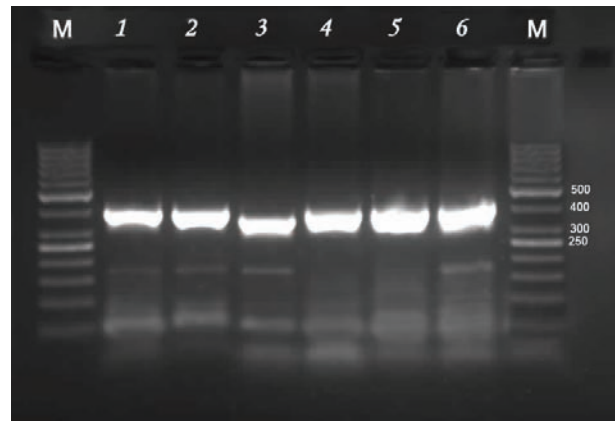


Figure 2. Representative results of mPCR products analysed by agarose gel electrophoresis (isolates). M: 50-bp DNA ladder; Lanes 1-6: isolates (only determined *R72H* gene region), 320 bp.

Şekil 2. İzolatlara ait mPCR ürünlerinin temsili sonuçları. M: 50-bp DNA ladder; No 1-6: izolatlar. (Sadece *R72H* gen bölgesini içeriyor.)



Figure 3. Kanagawa Phenomenon with two KP+ isolates in Wagatsuma agar (was prepared from 5 % human blood), 4. days in incubation.

Şekil 3. İnkübasyonun 4. gününde, KP pozitif izolatla Wagatsuma agarda (% 5 insan kanı ile hazırlanan) Kanagawa fenomeni.



Figure 4. Urea hydrolysis test. UH positive (*V. parahaemolyticus trh* positive control), UH negative.

Şekil 4. Üre hidroliz testi. UH pozitif (*V. parahaemolyticus trh* pozitif kontrol), UH negatif.

DISCUSSION AND CONCLUSION

According to researchers, food infection with *V. parahaemolyticus* is becoming widespread in the world, especially in the Far East and Asian countries (3, 8, 10, 32, 36, 53, 58). *V. parahaemolyticus* control studies have been carried out in bivalve molluscs production areas in European Union countries and in our country since 1999 (6, 7, 9).

It has been reported that the agent was isolated from 4.3 % to 75 % of bivalve molluscs samples (11, 14, 17, 25, 29, 46, 53, 56, 59). Researchers have declared that the agent is widespread in warm coast water microflora and that the incidence especially increases in summer season (July, August) (13, 20, 27, 30, 48). In this study, the samples were taken between September and May in 2007-2010. It was observed that our isolation rate was lower than previous researches in our country (2, 12, 35, 52) and other publications (11, 17, 25, 46, 54, 59) This result can be possibly due to seasonal features, salinity, and microbial quality of the water. The isolation rates of *V. parahaemolyticus* have been reported as 11.5 % in 583 bivalve molluscs samples by Akalın and Tuna (2), 14.3 % in 70 striped Venus by Aydın and Soyutemiz (12), 3-3.7 % in oysters taken from Trabzon coasts by Karaçam et al. (35) and 40 % in mussels taken from Samsun by Terzi et al. (52). İnal et al. (33) have reported that the agent was isolated from 37 (69.8%) of 53 fish

samples taken from the coasts between Samsun and Sinop (Black sea region) in summer season.

However, it has been reported that the agent wasn't isolated in clams taken from İzmir by Çaklı et al. (19) and in striped Venus taken from Black Sea, Marmara and Canakkale by Şentürk (50). In this work, *V. parahaemolyticus* wasn't isolated in 58 striped Venus samples taken from Balıkesir, either.

While some researchers have reported that *V. parahaemolyticus* isolates from sea products were generally KP- (1, 15, 24, 34), some researchers have obtained different results (13, 17, 47, 57). In this study, 32 of 34 isolates from seafood was KP- and 2 isolates was KP+.

Abdelnoor ve Roumani (1) have reported that 2 of 3 isolates from aquaculture products were KP+. Wong et al. (57) have found out that 92.4 % of them were KP+ in 371 isolates from the cases of food poisoning in Taiwan. In this study, 2 (5.8 %) of 34 isolates was determined to be KP+. Jhonson et al. (34) have noted that the isolates from food poisoning caused by *V. parahaemolyticus* in middle Atlantic region in America were KP- and the time of the isolation was October. Despite KP+ isolates are more pathogenic in humans and the agent was increasingly determined in summer diarrheas (13, 27, 30, 43, 48, 51), some researchers have reported different opinions in this subject (35, 43, 58).

It has been reported that KP+ or UH+ isolates were responsible for human infections (42). It has been concluded that 5.7 % of the isolates from seafood and 11.2 % of the isolates from human clinic cases by Honda et al. (31). 7.5 % of 132 isolates from clinical isolates by Osawa et al. (43), 58.4 % of 71.5 % isolates from sea water, oyster and sediment by Kaysner et al. (37), 8.2 % of 98 isolates from sea water and seafood by Akalın and Tuna (2), 59 % of 32 isolates by Terzi et al. (52) and 4 % of 371 isolates from clinical samples by Wong et al. (57) were UH+. In this study, all of the isolates were UH-. While this result didn't correlate with results of the researchers mentioned above, it correlated with the results of Aydın and Soyutemiz (12), because our and their isolates may have similar origins.

The isolation rates of *V. parahaemolyticus* have been considerably different in investigations in Turkey and other Europe countries. It has been described that samples taken from different regions, and water temperature, salinity and quality of the water were effective on the isolation rates of the agent (8, 13, 20, 21, 25, 36, 45).

There were no *tdh* and *trh* genes in 34 isolates in this study. And this result was relevant with the results that KP+ isolates have *tdh* gene and UH+ isolates have *trh* gene. But 2 KP+ isolates were *tdh*- and this did not fit the general rule (28, 52, 54).

Despite the general rule that *tdh*+ isolates were generally KP+ and these isolates caused diseases in humans, Zen-Yoji et al. (58) reported that the isolate from food poisoning was KP-. Jhonson et al. (34) also described that an isolate from a wound infection in a patient was KP-.

Consequently, all of the isolates were *tdh* and *trh* negative. All of the isolates were UH- and 32 of 34 were KP- (94.1 %) in this study. Even if these results seem to be positive regarding human health, 5.21 % of *V. parahaemolyticus* isolation rate may constitute an important risk for individuals consuming molluscs.

Acknowledgements

We would like to thank to Dr. Serra Tunalıgil, Assoc. Prof. Dr. Göknuş Terzi, Dr. Şerife İnçoğlu and Nihat Açıkgöz for their help.

KAYNAKLAR

1. **Abdelnoor, A.M., Roumani, B.M.** (1980) *Characterization of some Vibrio parahaemolyticus strains isolated from seafoods in Lebanon*. Zbl. Bakteriologie (B), 170 (5-6): 502-507.
2. **Akalın, N., Tuna, İ.** (1999) *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde 1998-1999 yıllarında muayene edilen çift kabuklu yumuşakça ve deniz suyu örneklerinde Vibrio parahaemolyticus izolasyonu*. Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 38: 85- 90.
3. **Alam, M.J., Tomochika, K.I., Miyoshi, S.I., Shinoda, S.** (2002) *Environmental investigation of potentially pathogenic Vibrio parahaemolyticus in the Seto-Inland Sea, Japan*. FEMS Microbiol. Lett. 208: 83–87.
4. **Anonymous.** (1998) Centers for Disease Control (CDC). *Outbreak of Vibrio parahaemolyticus infections associated with eating raw oysters – Pacific Northwest 1997*. Morb. Mortal Wkly. Rep., 47: 457–462.
5. **Anonymous.** (1998) TS/ISO 8914. *Mikrobiyoloji-Vibrio parahaemolyticus aranması için genel kurallar*. Ankara.
6. **Anonymous.** (2000) *Su Ürünleri Kalite Kontrolü Uygulama Talimatı*. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Ankara.
7. **Anonymous.** (2004) *Criteria for the Classification of Bivalve Mollusc Harvesting Areas Under Regulation* (EC) No: 854/2004.
8. **Anonymous.** (2011) Public Health Agency of Canada. *Vibrio parahaemolyticus*. Retrieved from <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds165e-eng.php>
9. **Anonymous.** (2008) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) *V. parahaemolyticus*. Retrieved from http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/vibriop.
10. **Anonymous** (2009) U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Draft risk assessment on the public health impact of Vibrio parahaemolyticus in raw molluscan shellfish*. Retrieved from: <http://permanent.access.gpo.gov/lps111991/vprisk.pdf>
11. **Awad, H.A., El Shater, M.A.** (1997) *Microbiological status and the depuration of the Egyptian oysters*. Vet. Med. J. Giza., 45 (3): 337-343.
12. **Aydın, A., Soyutemiz, E.** (2002) *Bazı balık türlerinden ve kum midyelerinden (Venus gallina) Vibrio parahaemolyticus izolasyonu ve identifikasyonu*. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 26: 1249-1253.
13. **Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E., Citterio, B.** (2000) *Occurrence and expression of virulence-related properties of Vibrio species isolated from widely consumed seafood products*. Int. J. Food Microbiol., 54 : 9–18.
14. **Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Kaysner, C.A.** (1999) *Detection of total and hemolysin-producing Vibrio parahaemolyticus in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh*. J. Microbiol. Methods. 36: 215–225.
15. **Berzero, R., Crescente, M.D., Zaffalon, C.** (1982) *Vibrio parahaemolyticus in molluscs*. G. Bacteriol. Virol. Immunol., 75 (7-12): 264-272.
16. **Beuchat, L.R.** (1982) *Vibrio parahaemolyticus: Public health significance*. Food Technol., 36 (3): 80-83.
17. **Binta, M.G., Nyaga, P.N.** (1982) *The distribution of Vibrio parahaemolyticus serotypes in Kenyan seafish, shellfish, marine water and sediment*. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 76 (4): 497-499.

18. Chan, S.S.W., Nig, K.C., Cheung, T.H., Rainer, T.H. (2002) *Vibri parahaemolyticus*: A leading of infectious diarrhoea in Hong Kong. Hong Kong J. Emerg. Med., 9 (1): 23-29.
19. Çaklı, Ş., Hindioğlu, A., Arda, M. (1997) İzmir Körfezi'nden farklı istasyonlardan toplanan akitades (*Tapes decussatus*, L. 1758)'lerin mikrobiyolojik kalite kontrolleri. Akdeniz Balıkçılık Kongresi, 9-11 Nisan, İzmir.
20. Deepanjali, A., Sanath Kumar, H., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2005) Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. Appl. Environ. Microbiol., 71: 3575-3580.
21. DePaola, A., Hopkins, L.H., Peeler, J.T., Wentz, B., McPhearson, R.M. (1990) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2299-2302.
22. DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., Cook, D.W. (2000) Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). Appl. Environ. Microbiol., 66: 4649-4654.
23. Dileep, V., Kumar, H. S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I. (2003) Application of PCR in detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. Lett. Appl. Microbiol., 36: 423-427.
24. Fang, S.W., Huang, W.W., Chen, L.H. (1987) Contamination of seafood by *Vibrio parahaemolyticus* in Taiwan. Chinese J. Microbiol. Immunol., 20 (2): 140-147.
25. Franca, S.M., Gibbs, D.L., Samuels, P., Johnson, W.D. (1980) *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. J. Am. Med. Assoc., 244 (6): 587-588.
26. Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., Ueho, T. (1953) On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. Med. J. Osaka Univ. 4: 299-305.
27. Ghosh, A.R., Sehgal, S.C. (1998) Haemolysin production by environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from andamans. Indian J. Med. Res., 107: 151-154.
28. Green, M., Buenaventura, E., Wong, C., Liu, J. (2006) Specific Detection of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Using A Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Based on the R72H Taxonomic Marker and the Hemolysin Genes *tdh* and *trh*. Health Products and Food Branch, Laboratory Procedure, MFLP-23, Ottawa.
29. Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., Pommepuy, M. (2002) Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. J. Appl. Microbiol., 92: 1123-1135.
30. Hlady, W.G., Klontz, K.C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. J. Infect. Dis., 173 (5): 1176-1183.
31. Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T. (1988) Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. Infect. Immun., 56: 961-965.
32. Honda, S., Matsumoto, S., Miwatani, T., Honda, T. (1992) A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhoea, seawater and imported frozen seafoods. Eur. J. Epidemiol., 8 (6): 861-864.
33. Inal, T., Yurtyeri, A., Ambarcı, U. (1973) Untersuchungen ber das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* im Jahre 1971 in der Türkei. Fleischwirtschaft. 53 (9): 1299-1301.
34. Jhonson, D.E., Weinberg, L., Ciarkowski, J., West, P., Colwell, L.L. (1984) Wound infection caused by Kana-Gawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. J. Clin. Microbiol., 20 (4): 811-812.
35. Karaçam, H., Boran, M., Köse, S. (1997) Trabzon sahillerindeki midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) bakteriyel kontaminasyon. Akdeniz Balıkçılık Kongresi. 9-11 Nisan, İzmir.
36. Kaneko, T., Colwell, R.R. (1973) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J Bacteriol., 113: 24-32.
37. Kaysner, C.A., Abeyta, C. Jr., Stott, R.F., Lilja, J.L., Wekell, M.M. (1990) Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. Appl. Environ. Microbiol., 56 (4): 904-907.
38. Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. (2003) Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Christchurch Science Centre. Erişim: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/vibrio-Parahaemolyticus.pdf>. Ocak, 2011.
39. Lee, C.Y., Pan, S.F. and Chen, C.H. (1995) Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1311-1317.
40. Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S. (1969) In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J. Bacteriol., 100: 1147-1149.
41. Nishibuchi, M., Kaper, J.B. (1995) Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect. Immun., 63: 2093-2099.

42. **Oberhofer, T.R., Podgore, J.K.** (1982) *Urea-hydrolyzing Vibrio parahaemolyticus associated with acute gastroenteritis*. J. Clin. Microbiol., 16 (3): 581-583.
43. **Osawa, R., Okitsu, T., Morozumi, H., Yamai, S.** (1996) *Occurrence of urease-positive Vibrio parahaemolyticus in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes*. Appl. Environ. Microbiol., 62 (2): 725-727.
44. **Osawa, R., Arakawa, E., Okitsu, T., Yamai, S., Watanabe, H.** (2002) *Levels of thermostable direct hemolysin produced by Vibrio parahaemolyticus O3: K6 and other serovars grown anaerobically with the presence of a bile acid*. Curr. Microbiol., 44 (4): 302-305.
45. **Quintoil, M.N., Porteen, K., Pramanik, A.K.** (2007) *Studies on occurrence of Vibrio parahaemolyticus in fin fishes and shellfishes from different ecosystem of West Bengal*. Livestock Research for Rural Development., 19 (1).
46. **Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli I., Caprioli, A., Luzzi, I.** (1999) *Occurrence of Vibrio and other pathogenic bacteria in Mytilus galloprovincialis (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy*. Int. J. Food. Microbiol., 49 (1-2): 43-48.
47. **Robert-Pillot, A., Gue'nole', A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L.** (2004) *Occurrence of the tdh and trh genes in Vibrio parahaemolyticus isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France*. Int. J. Food Microbiol., 91: 319-325.
48. **Saha, M.R., Sen, D., De, S.P., Sircar, B.K., Sengupta, P.G., Pal, S.C.** (1982) *Kanagawa phenomenon and serotypic pattern of Vibrio parahemolyticus strains isolated from various sources in Calcutta*. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 76 (6): 786-789.
49. **Shinoda, S., Nakahara, N., Ninomiya, Y., Itoh, K., Kane, H.** (1983) *Serological method for identification Vibrio parahaemolyticus from marine samples*. Appl. Environ. Microbiol., 45 (1): 148-152.
50. **Şentürk, A.** (1997) *Kum midyelerinin (Chamelea gallina L.1758) işlenmesi ve mikrobiyolojik kriterlerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bil. Enst., İstanbul.
51. **Teramoto, T., Nakanishi, H., Maejima, K.** (1969) *Kanagawa reaction of Vibrio parahaemolyticus isolated from food poisoning*. Modern Media, 15: 215.
52. **Terzi, G., Büyüktanır, Ö., Yurdusev, N.** (2009) *Detection of the tdh and trh genes in Vibrio parahaemolyticus isolates in fish and mussels from middle black sea coast of Turkey*. Lett. Appl. Microbiol., 49: 757-763.
53. **Torres-Vitela, M.R., Fernandez-Escartin, E.** (1993) *Incidence of Vibrio parahaemolyticus in raw fish, oysters and shrimps*. Rev. Latinoam. Microbiol., 35 (3): 267-272.
54. **Twedt, R.M., Novelli, R.E., Spaulding, P.L., Hall, H.E.** (1970) *Comparative hemolytic activity of Vibrio parahaemolyticus and related vibrios*. Infect.Immun., 1 (4): 394-399.
55. **Twedt, R.M.** (1989) *Vibrio parahaemolyticus*. pp: 543-568. In: Doyle, M.P. (Ed). Foodborne Bacterial Pathogens, Marcel Dekker, Inc., Newyork, USA.
56. **Van den Broek, M.J., Mossel, D.A., Eggenkamp, A.E.** (1979) *Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in Dutch mussels*. Appl. Environ. Microbiol., 37 (3): 438-442.
57. **Wong, H.C., Lui S.H., Ku, L.W, Lee, I.Y., Wang, T.K., Kuo, L.P., Shih, D.Y.** (2000) *Characterization of Vibrio parahaemolyticus isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan*. J. Food Protect., 63 (7): 900-906.
58. **Zen-Yoji, H., Sakai, S., Kudo, Y., Ito, T., Maruyama, T.** (1970) *Food poisoning due to Kanagawa-negative Vibrio parahaemolyticus*. Media Circle, 15: 82.
59. **Zulkifli, Y., Alitheen, N.B., Son, R., Yeap, S.K., Lesley, M.B., Raha, A.R.** (2009) *Identification of Vibrio parahaemolyticus isolates by PCR targeted to the toxR gene and detection of virulence genes*. Int. J. Food Microbiol., 16: 289-296.

Yazışma Adresi:

Dr. Meriç Lütüfi AVSEVER

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü

Bakteriyel Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı

35040 Bornova-İZMİR

E-mail: lutfiavsever@gmail.com

TÜKETİME SUNULAN BALLARDA SÜLFONAMİD TÜREVİ ANTİBİYOTİKLERİN KALINTILARININ BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF SULPHONAMIDE ANTIBIOTICS RESIDUES IN HONEY PRESENTED FOR CONSUMPTION

A. Turan ERDOĞDU¹ Yasemin COŞKUN² Sema İSPİRLİ GÜVEN³

Geliş Tarihi (Received): 15.08.2011

Kabul Tarihi (Accepted): 15.09.2011

ÖZET

Bu çalışmada, 2007, 2008 ve 2009 yıllarında laboratuvarımıza gelen 536 örnekte sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiyazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametaksazol, sülfadimetoksin kalıntı analizi gerçekleştirilmiştir. Kalıntı analizlerinde miktar tayini analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-FLD) tekniği, doğrulama analizi için likid kromatografi sıralı kütle spektrometre (LC-MS/MS) tekniği kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 2 örnekte ortalama 102.45 µg/kg (6.9-198 µg/kg) sülfanilamid, 1 örnekte 24.86 µg/kg sülfadiazin, 108 örnekte ortalama 597.34 µg/kg (6.2-13356.7 µg/kg) sülfametazin, 9 örnekte ortalama 25.01 µg/kg (10.66-70.1 µg/kg) sülfametaksazol, 6 örnekte ortalama 157.25 µg/kg (25.4-542.5 µg/kg) sülfadimetoksin kalıntısı tespit edilmiştir. Örneklerin tümünde sülfanilamid ile kirlenme sıklığı % 0.37, sülfadiazin ile kirlenme sıklığı % 0.19, sülfametazin ile kirlenme sıklığı % 20.15, sülfametaksazol ile kirlenme sıklığı % 1.68, sülfadimetoksin ile kirlenme sıklığı % 1.12 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: Bal, HPLC-FLD teknik, kalıntı, LC-MS/MS teknik, sülfonamid.

SUMMARY

In this study, sulfanilamid, sulfadiazin, sulfathiazole, sulfamerazine, sulfametazine, sulfamethoxazole and sulfadimethoxine residue analyses were performed in 536 samples in 2007, 2008 and 2009. High performance liquid chromatography (HPLC-FLD) technique for analyses of amount determination and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for confirmation analyses were used at the residue analyses. At the results of analyses, 2 samples containing sulfanilamid at an average level of 102.45 µg/kg (6.9-198 µg/kg), 1 sample containing 24.86 µg/kg sulfadiazin, 108 samples containing sulfamethazine at an average level of 597.34 µg/kg (6.2-13356.7 µg/kg), 9 samples containing sulfamethoxazole at an average level of 25.01 µg/kg (10.66-70.1 µg/kg) and 6 samples containing sulfadimethoxine at an average level of 157.25 µg/kg (25.4-542.5 µg/kg) were detected. In all of samples, contamination with sulfanilamid at a level of 0.37 %, contamination with sulfadiazin at a level of 0.19 %, contamination with sulfamethazine at a level of 20.15 %, contamination with sulfamethoxazole at a level of 1.68 % and contamination with sulfadimethoxine at a level of 1.12 % were calculated.

Key words: Honey, HPLC-FLD technique, LC-MS/MS, technique, residue, sulphonamide.

GİRİŞ

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi, gelişmenin hızlandırılması ve yemden yararlanmanın artırılması, paraziter hastalıkların kontrolü ve beslenmenin desteklenmesi amacıyla çok sayıda ilaç, hormon, vitamin ve mineral madde kullanılmaktadır (7). Ükelere göre az çok ayırım göstermekle beraber, bütün dünyada hayvancılık sektöründe kullanılan her çeşitten ilaç ve yem katkı

maddesinin ortalama % 30'unu antibakteriyel ilaçların oluşturduğu ve bunların da en az % 40'ünün koruyucu ve verim artırıcı amaçla kullanıldığı düşünülmektedir (12).

Besin değeri olan hayvanlarda, yasaklanmış veya tüketimine yasal olarak müsaade edilmiş antibakteriyel ilaçların, bilinçsizce ve suistimal derecesinde kullanımı sonucunda halk sağlığı açısından ciddi sakıncalar oluşturabileceği anlaşıl-

¹ Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR.

² Dr. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR.

³ Dr. Su Ürünleri Mühendisi, Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, İZMİR.

mıştır. Özellikle gıda değeri olan hayvanlarda ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece et, süt, yumurta, bal gibi gıdalarda ilaç kalıntılarının bulunmasının önemi güncelliğini koruyacaktır (8).

Türk Gıda Kodeksi'ne göre ballarda sülfonamid türevi antibiyotik kalıntısının bulunmasına izin verilen herhangi bir kalıntı düzeyi verilmemiştir (3).

Bu çalışmada veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan ancak arııcılıkta kullanımı yasak olan sülfonamid türevi antibiyotiklerden sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametaksazol ve slfadimetoksinin ballarda kalıntı durumu incelenerek gıda güvenliği ve toplum sağlığı yönünden yapılan çalışmalara katkı sağlamak amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada 2007, 2008 ve 2009 yıllarında Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne gelen 536 bal numunesi materyal olarak kullanılmıştır.

Metot

Numunelerden sülfonamidlerin özütlenmesi triklorasetik asit ile gerçekleştirildi. Triklorasetik asit ile zdrlen numune üzerine asetonitril ve diklormetan ilave edilerek santrifüj edildi. st faz alınarak üzerine n-propanol ilave edildi ve azot gazı altında evaporatörde uçuruldu. zt %1 asetik asit içeren distile su ile zlerek HPLC-FLD ile analiz edildi. HPLC-FLD ile analiz edildikten sonra pozitif olarak değerlendirilen numunelerin ztleri LC-MS/MS sisteminde analiz edilerek kromatografide tespit edilen piklerin ilgili bileşiğe ait olup olmadığının tespiti için iyonlarına bakıldı. İyonlar ilgili bileşiğe ait ise HPLC-FLD cihazında tespit edilen miktar sonuç olarak verildi.

Çalışmada Sülfanilamid (Riedel De Haen, 46874, % 99.9'luk saflıkta), sülfadiazin (Riedel De Haen, 35033, % 99.6 saflıkta), sülfatiazol (Riedel De Haen, 46842, % 99.9 saflıkta), sülfamerazin (Sigma, S8876, % 99.9 saflıkta), sülfametazin (Riedel De Haen, 46802, % 99.9 saflıkta), sülfametaksazol (Riedel De Haen, 46850, % 99.9 saflıkta) ve sülfadimetoksin (Riedel De Haen, 46794 % 99.4 saflıkta) sertifikalı standartları

kullanıldı. Analizde HP Agilent 1100 serisi HPLC, Agilent kolon sonrası trevlendiricisi, FLD dedektör ve Agilent 6460 LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır.

Standart ve Solüsyonların Hazırlanması

Sülfanilamid Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfanilamid standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfadiazin Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfadiazin standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfatiazol Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfatiazol standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfamerazin Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfamerazin standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfametazin Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfametazin standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfametaksazol Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfametaksazol standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfadimetoksin Ana Stok Standardı (1000 mg/kg): Sülfadimetoksin standardından 10 ml hacimli balon jojeye $10 \pm 0,01$ mg tartım yapıldı, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfonamid Karışım Ara Stok Standardı (10 mg/kg): Hacmi 5 ml olan balon joje içerisine sülfonamid ana stok solüsyonlarının her birinden 50' şer l konuldu, çizgisine kadar asetonitril ile tamamlandı.

Sülfonamid Karışım 1000 ppb alışma Standart Solüsyonu (1000 g/kg): HPLC vialine sülfonamid karışım ara stok standardından 100 l alındı, mobil faz A ile 1 ml'ye tamamlandı.

Sülfonamid Karışım 100 ppb alışma Standart Solüsyonu (100 g/kg): HPLC vialine

sülfonamid karışım 1000 ppb çalışma standart solüsyonundan 100 µl alındı, mobil faz A ile 1 ml'ye tamamlandı.

Sülfonamid Karışım 50 ppb Çalışma Standart Solüsyonu (50 µg/kg): HPLC vialine sülfonamid karışım 1000 ppb çalışma standart solüsyonundan 50 µl alındı, mobil faz A ile 1 ml'ye tamamlandı.

Sülfonamid Karışım 25 ppb Çalışma Standart Solüsyonu (25 µg/kg): HPLC vialine sülfonamid karışım 100 ppb çalışma standart solüsyonundan 250 µl alındı, mobil faz A ile 1 ml'ye tamamlandı.

Sülfonamid Karışım 10 ppb Çalışma Standart Solüsyonu (10 µg/kg): HPLC vialine sülfonamid karışım 100 ppb çalışma standart solüsyonundan 100 µl alındı, mobil faz A ile 1 ml'ye tamamlandı.

Mobil Faz A'nın Hazırlanması: Hacmi 2000 ml olan balon jöjeye 20 ml asetik asit konuldu, son hacme ultra saf su ile tamamlandı. HPLC-FLD sisteminde kullanıldı.

Mobil Faz B'nin Hazırlanması: Hacmi 500 ml olan balon jöjeye 100 ml ultra saf su konuldu, üzerine 400 ml gradient saflıkta saf asetonitril ilave edildi. HPLC-FLD sisteminde kullanıldı.

LC-MS/MS Mobil Faz A'nın Hazırlanması: Hacmi 2000 ml olan balon jöje içerisine 0,252 gr okzalik asit ve 4 ml formik asit konuldu, son hacme ultra saf su ile tamamlandı.

LC-MS/MS Mobil Faz B'nin Hazırlanması: Hacmi 1000 ml olan balon jöje içerisine 1 litre asetonitril konuldu, üzerine 1 ml formik asit ilave edildi.

Türevlendirici Hazırlanması: Hacmi 500 ml olan balon jöje içerisine 100 ml asetonitril konuldu, 100 mg florosamin ilave edilerek eritildi. Üzerine 300 ml mobil faz A ve 200 µl 2-mercaptoethanol ilave edilerek iyice karıştırıldı.

Sülfonamid Standart Çözeltilerinin HPLC-FLD Cihazına Tanıtılması

Sülfonamid karışım 10 µg/kg çalışma standart solüsyonu HPLC-FLD cihazında analiz edilerek sülfonamid türevi bileşiklerin alıkonulma süresi belirlendi.

Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Çalışmada sülfonamid türevi antibiyotiklerin her birinden 10, 25, 50 ve 100 µg/kg derişim aralığında standart çözeltileri hazırlandı ve HPLC-FLD ile analiz edildi. Analizler sonucunda bu standartların her bir derişimine karşı gelen alanlar grafik edilerek doğrusal bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Geri Kazanım Çalışmaları

İçerisinde sülfonamid türevi antibiyotik olmadığı bilinen bal numunesi üzerine her bir sülfonamid bileşiğinden, numunede 10 µg/kg olacak şekilde yükleme yapıldı. Numune hazırlama işlemleri aynı sıra ile tekrar edildi.

Daha önceden analizi yapılmış ve içerisinde sülfonamid türevi antibiyotik bulunmayan bal numunesi, kontrol bal numunesi olarak kullanıldı. Elde edilen özü, HPLC-FLD ile analiz edilerek kromatogramı alındı. Daha sonra kontrol bal numunesi üzerine her bir sülfonamid standardından 10 µg/kg ilave edilerek hazırlanan yüklü numunelerin kromatogramları alındı. Standart ilave edilen kromatogramlara göre hesaplanan sülfonamid miktarından, kontrol bal numunesinde bulunan sülfonamid miktarı çıkartıldı. Bulunan değer kontrol bal numunesine ilave edilen sülfonamid derişim miktarına bölünüp, 100 ile çarpılarak % geri kazanım oranı hesaplandı.

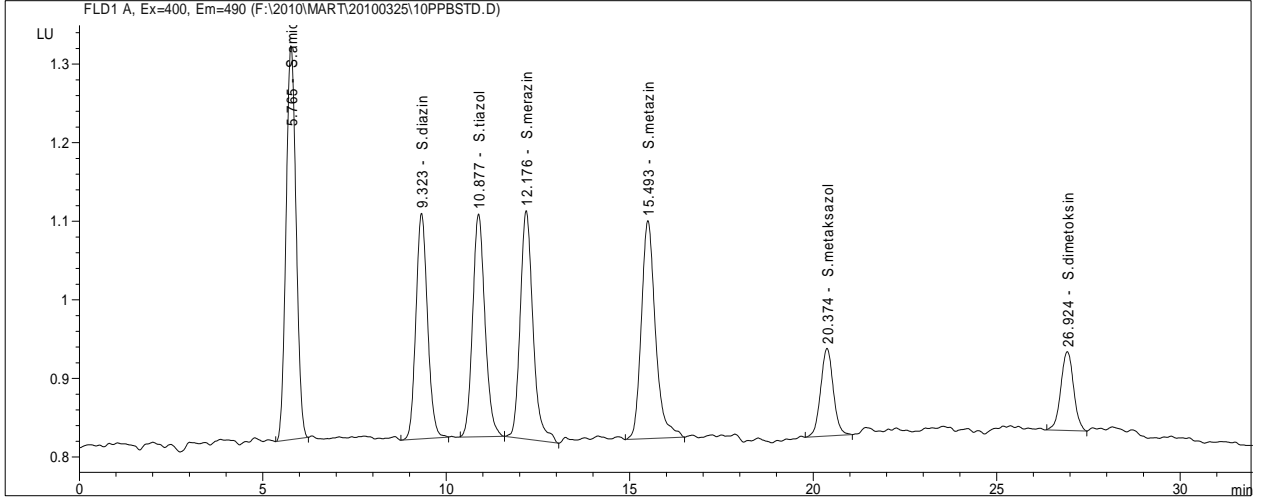
Ballarda bulunan sülfonamid türevi antibiyotik kalıntılarının tespiti için numunelerin hazırlanmasında ve LC-MS/MS cihazı ile doğrulanmasında Verzeznassi ve ark. (14)'nın kullandığı metot, HPLC cihazında kolon sonrası türevlendirme ile tespit ve miktar tayini için ise Maudens ve ark. (9)'ın kullandığı metot üzerinde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır.

BULGULAR

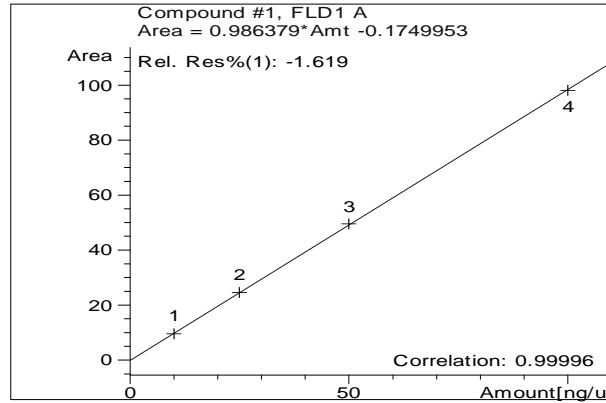
Çalışmada 536 bal numunesi, sülfonamid türevi antibiyotikler yönünden analiz edilmiştir. Ballarda sülfonamid türevi bileşiklerin belirlenmesinde elde edilen kromatogramlar ve kalibrasyon eğrisi Şekil 1-5'te gösterilmiştir. Sülfonamid türevi bileşiklerin alıkonulma süreleri Tablo 1'de, sülfonamid türevi bileşiklerin belirleme ve hesaplama alt sınırları Tablo 2'de, sülfonamid türevi bileşiklerin ballardan geri kazanım oranları Tablo 3'te

verilmiştir. Numunelerden 143 adedi 2007 yılında, 208 adedi 2008 yılında, 185 adedi ise 2009 yılında analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, 2 numunede sülfanilamid, 1 numunede sülfadiazin,

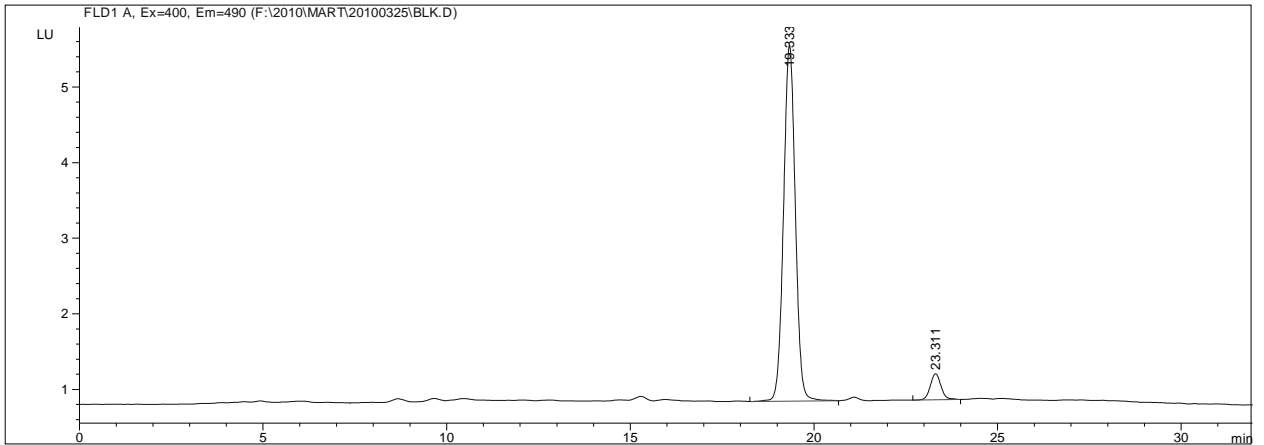
108 numunede sülfametazin, 9 numunede sülfametaksazol, 6 numunede sülfadimetoksin kalıntısı tespit edilmiştir (Tablo 4).



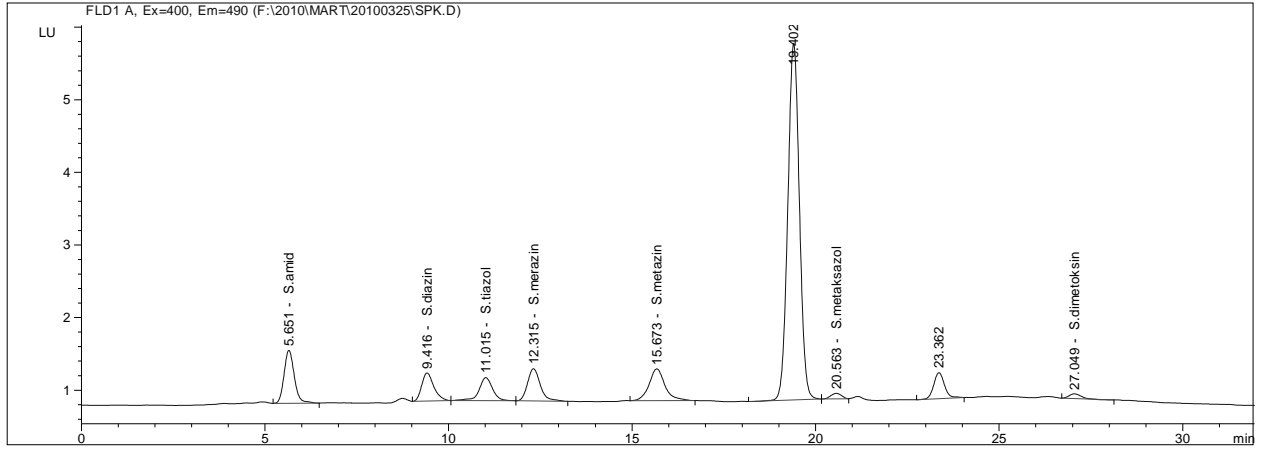
Şekil 1. Sülfonamid türevi bileşiklerin toplu kromatogramı (1: Sülfanilamid, 2: Sülfadiazin, 3: Sülfatiazol, 4: Sülfamerazin, 5: Sülfametazin, 6: Sülfametaksazol, 7: Sülfadimetoksin).



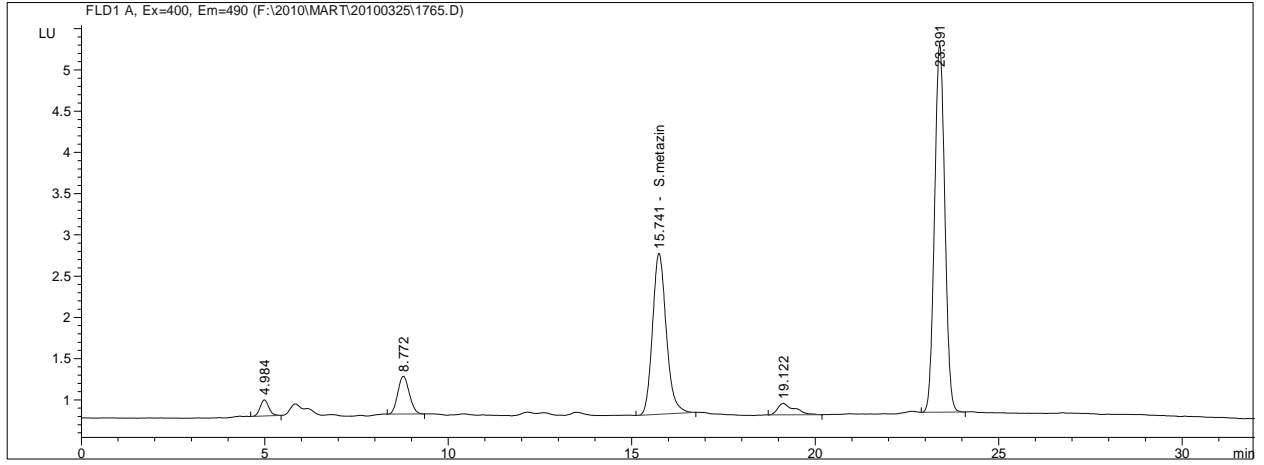
Şekil 2. Her bir sülfonamid bileşiğinin 10, 25, 50 ve 100 µg/kg standart çözeltisinden hazırlanan kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3. Negatif numune kromatogramı.



Şekil 4. Sülfonamid kalıntısı içermeyen balın üzerine 10 µg/kg sülfonamid türevi antibiyotik standardı yüklemeye yapılarak elde edilen kromatogramı.



Şekil 5. Pozitif numune kromatogramı.

Tablo 1. Sülfonamid Türevi Bileşiklerin Alınma Süreleri.

Bileşik	Alınma Süresi (dk)
Sülfanilamid	5.76
Sülfadiazin	9.34
Sülfatiazol	10.84
Sülfamerazin	12.32
Sülfametazin	15.84
Sülfametaksazol	20.15
Sülfadimetoksin	26.56

Tablo 2. Sülfonamid Türevi Bileşiklerin Belirleme ve Hesaplama Alt Sınırları.

Bileşik	Belirleme Alt Sınırı (µg/kg)	Hesaplama Alt Sınırı (µg/kg)
Sülfanilamid	2.05	6.83
Sülfadiazin	1.61	5.36
Sülfatiazol	1.65	5.51
Sülfamerazin	2.0	6.67
Sülfametazin	2.2	6.34
Sülfametaksazol	1.56	5.20
Sülfadimetoksin	2.02	6.73

Tablo 3. Sülfonamid Türevi Bileşiklerin Ballardan Geri Kazanım Oranları.

Bileşik	Geri Kazanım Oranları (%)
Sülfanilamid	59.0
Sülfadiazin	60.1
Sülfatiazol	57.6
Sülfamerazin	62.2
Sülfametazin	61.5
Sülfametaksazol	53.7
Sülfadimetoksin	50.7

Tablo 4. Numunelerde tespit edilen bileşikler, ortalama değerleri, en alt ve en üst değerler ile numunelerin kirlenme sıklığı.

Bileşik	Pozitif Tespit Edilen Numune Sayısı				Tespit Edilen Ortalama, En Alt ve En Üst Değerler µg/kg	Kirlenme Sıklığı (%)			
	2007	2008	2009	Toplam		2007	2008	2009	Toplam
Sülfanilamid	2	0	0	2	102.45 ±135.1281 (6.9-198)	1.40	0	0	0.37
Sülfadiazin	0	0	1	1	24.86	0	0	0.54	0.19
Sülfametazin	21	41	46	108	597.34 ± 2048.384 (6.2-13356.7)	14.69	19.7	24.86	20.15
Sülfametaksazol	7	2	0	9	25.01 ± 17.688163 (10.66-70.1)	4.90	0.96	0	1.68
Sülfadimetoksin	6	0	0	6	157.25 ± 202.07791 (25.4-542.5)	4.20	0	0	1.12
TOPLAM	36	43	47	126		25.19	20.66	25.4	23.51

TARTIŞMA VE SONUÇ

Besinlerdeki ilaç kalıntılarına karşı tüketici sağlığının etkin biçimde korunabilmesi için her çeşit hayvansal besinde bulunacak ilaç kalıntısı çeşitleriyle kirlenme düzeylerinin sınırlandırılması son derece önem taşır (7). Hayvansal besinlerle sürekli tüketilen sülfonamid türevleri başta kristaluri riski olmak üzere, böbreklerde işlev bozukluğuna yol açarlar. Genel nüfus popülasyonunda sülfonamid türevlerine karşı aşırı duyarlılık yönünden önemli bireysel ayrımlar bulunmaktadır. Bununla beraber gerek sağaltım amacıyla gerekse besin kirliliği halinde sülfonamid alımına bağlı olarak, maruz kalan insanlarda % 1.5-2 sıklıkla deri ve mukozalarda lezyonlar ve serum hastalığı şeklinde sülfonamid alerjilerinin gelişebileceği anlaşılmıştır. Ayrıca önceden sülfonamidlere duyarlı hale gelmiş kişilerde anafilaksi gelişebileceğine ilişkin raporlar da bulunmaktadır (12). Sıçanlarda yapılan deneysel bir çalışmada (8), yeme 1200-1400 ppm katılan sülfametazinin 24 ayda % 16-33

sıklıkta tiroid bezinde büyüme ve tümör sıklığında artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Başta bal olmak üzere tüm arı ürünlerinin insanlara faydalı olabilmesi için hiçbir yabancı madde ve kalıntı içermemesi gerekir. Arı hastalıklarındaki ilaç uygulamaları bal ve bal mumunda kalıntı bırakır. Arı ürünlerinde ortaya çıkan kalıntılar, arıların parazit, bakteri, mantar ve protozoal hastalıklarının sağaltımında kullanılan ilaçların arılar tarafından bal özü, çiçek tozları vb. besinler ile kovana getirilmeleri sonucu dolaylı yollardan meydana gelmektedir (4).

Besinlerdeki ilaç kalıntıları ile ilgili düzenlemeler Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından yapılmaktadır. Bugüne kadar Kodeks Alimentarius'ta balda sülfonamid türevi ilaç kalıntıları için belirlenmiş herhangi bir değer yoktur. Avrupa Birliği'nin 26 Haziran 1990'da yayımlanan 2377/90 numaralı tüzüğüne göre de balda antibiyotik bulunmaması gerekmektedir (1).

Yapılan çalışma sonucunda çiçek ballarından elde edilen sonuçlarda herhangi bir sorun yaşanmazken çam balı, kestane balı gibi diğer ballara ait HPLC kromatogramında sülfadimetoksin standardının geldiği zamanda doku piki gelmesi nedeni ile yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bunun önlenmesi amacıyla HPLC-FLD ile analiz edildikten sonra pozitif olarak değerlendirilen numunelerin özütleri, LC-MS/MS sisteminde de analiz edilerek kromatografide tespit edilen piklerin ilgili bileşiğe ait olup olmadığının tespiti için iyonlarına bakılmaktadır.

Güneş ve ark.(5) tarafından Güney Marmara Bölgesi'nden 50 farklı kovandan toplanan kestane, çam ve ıhlamur balları oksitetrasiklin ve sülfonamid türevi bileşikler yönünden LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiş ve herhangi bir kalıntıya rastlanmamıştır. Bu sonuç, Güney Marmara Bölgesi'nde sülfonamid türevi antibiyotik kullanılmadığını, ülkemiz genelinde bulunan kirliliğin diğer bölgelerden veya ithal edilen ballardan kaynaklandığını göstermektedir.

Uludağ (13) tarafından Ege Bölgesi'nden toplanan 103 bal örneği, sülfonamid türevi bileşikler yönünden HPLC yöntemi ile analiz edilmiş; bu örneklerden 24'ünde sülfonamid türevi ilaç kalıntısı tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin 17 adedinde (9.2-9901 µg/kg) sülfametazin, 5 adedinde (9.94-22.56 µg/kg) sülfametaksozol, 3 adedinde de (9.43-28.5 µg/kg) sülfamerazin kalıntısı bulunduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuç sülfametazin kalıntısı yönünden uyumlu, sülfametaksozol ve sülfamerazin kalıntısı yönünden yüksek bulunmuştur.

Heering ve ark.(6) tarafından Avrupa, Asya, Okyanusya ve Amerika kıtasındaki çeşitli ülkelerden toplanan toplam 100 bal numunesi, enzyme immunoassays (EIA) ile tetrasiklin, streptomisin ve sülfatiazol bileşikler yönünden analiz edilmiştir. Numunelerin % 42'si EIA'de pozitif olarak bulunmuştur. Bunların % 25'i bir bileşik, % 12'si iki bileşik, % 3'ü üç bileşik yönünden pozitif bulunmuştur. EIA'de % 16 sülfatiazol pozitif bulunmuş olup HPLC ile yapılan doğrulama analizinde sülfonamid türevi kalıntı tespit edilememiştir.

Sheridan ve ark. (11) tarafından Amerika'da 25 ülkeden toplanan 116 bal numunesi, 14 sülfonamid türevi antibiyotik ve kloramfenikol yönünden LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve % 38'inin belirtilen antibiyotiklerden en az biri ile kirlenmiş olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç, Türkiye'de elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Kanada Gıda Kontrol Kurumu'nun 1999-2004 yılları arasında hazırladığı Bal Analiz Raporun'da, ülkede üretilen ballarda sülfonamidler yönünden 1999-2000 ve 2001-2002 yıllarında toplam 216 analiz yapılmış ve kalıntıya rastlanmamış, 2000-2001 yıllarında 58 analiz yapılmış ve % 4.88, 2002-2003 yıllarında 87 analiz yapılmış ve % 3.53, 2003-2004 yıllarında 250 analiz yapılmış ve % 0.81 oranında sülfonamid türevi antibiyotik kalıntısına rastlanmıştır. Ülkeye başka ülkelere gelen ballarda sülfonamidler yönünden yapılan analizlerde 2001-2002 yılında yapılan 32 analizde kalıntıya rastlanılmamış, 1999-2000 yıllarında 109 analiz yapılmış % 13.04, 2000-2001 yıllarında 15 analiz yapılmış % 20, 2002-2003 yıllarında 229 analiz yapılmış % 22.57, 2003-2004 yıllarında 141 analiz yapılmış % 2.33 oranında kalıntıya rastlanmıştır (2).

Kanada Gıda Kontrol Kurumu'nun sülfonamid türevi antibiyotik kalıntısı yönünden elde ettiği sonuç, Türkiye'de tüketime sunulan balların Kanada'da satılan ballardan daha kirli olduğunu göstermektedir.

Belçika'da 2000-2002 yılları arasında ülkesel izleme programı kapsamında Belçika'lı üreticiler tarafından üretilen 72 bal örneği ve marketlerde satılan 98 bal örneği streptomisin, kloramfenikol bileşikler ve sülfonamid, tetrasiklin ve beta-laktam türevi bileşikler yönünden analiz edilmiştir. Sülfonamid türevi bileşikler yönünden yapılan analizlerde, Belçika'lı üreticiler tarafından üretilen ballarda % 4.2, Belçika marketlerinde satılan ballarda ise % 31.6 oranında kalıntıya rastlanılmıştır. Pozitif örneklerde sülfatiazol (33-430 µg/kg), sülfametaksozol (20-73 µg/kg) ve düşük yoğunlukta sülfametazin ve sülfadiazin (<20 µg/kg) kalıntısı bulunduğu belirlenmiştir (10). Türkiye'de satılan ballarla karşılaştırıldığında sülfametaksozol kalıntı sıklığının Belçika ile yakın olduğu, sülfametazin kalıntı sıklığının Belçika'da daha az, sülfatiazol kalıntı sıklığının Türkiye'de daha az olduğu görülmüştür.

Çalışmada elde edilen sonuçların değerlendirilmesi neticesinde sülfametazin kalıntı sıklığının

yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum arıcılıkta sülfametazin kullanımının yaygın olduğunu, dolayısıyla tüketicilerin ilaç kalıntısı içeren besinler vasıtasıyla birçok tehlikeyle karşı karşıya olduklarını göstermektedir.

Bu çalışma, balların sülfonamidler ve diğer antibiyotik kalıntıları yönünden ulusal kalıntı izleme planı çerçevesinde düzenli olarak denetlenmesinin halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından önemli olduğunu ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. **Anon.** (1990) *Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.* Official Journal of the European Communities. No L224/1,18.08.1990.
2. **Anon.** (2004) *Report on pesticides, agricultural chemicals, veterinary drugs, environmental pollutants and other impurities in agri-food commodities of animal origin honey products.* Canadian Food Inspection Agency- Food Safety Directorate-Animal Origin-Honey Products. Erişim: http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/microchem/resid/2003-2004/anima_hme.shtml. Erişim Tarihi: 23.09.2010.
3. **Anon.** *Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Veteriner İlaçlarına Ait Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (2011/20 sayılı).* 29.04.2011 tarih ve 27919 (Mükerrer) sayılı RG.
4. **Daş, Y.K., Kaya, S.** (2004) *Türkiye'de üretilen ballarda bazı sentetik piretroid insektisid kalıntılarının incelenmesi.* Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 15 (1-2): 15-28.
5. **Güneş, M.E., Güneş, E., Cıbık, R.** (2009) *Oxytetracycline and sulphonamide residues analysis of honey samples from southern Marmara region in Turkey.* Bul. J. Agric. Sci., 15 (No 2): 163-167.
6. **Heering, W., Usleber, E., Dietrich, R., Märtilbauer, E.** (1998) *Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey.* Analyst, 123 (12): 2759-62.
7. **Kaya, S.** (1994) *Besinlerdeki veteriner ilaç kalıntıları, bilimsel ve yasal denetim.* Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim 13-14, Ankara, Türkiye.
8. **Kaya, S.** (2005) *Gıdalarda veteriner hekimliği ile ilgili kalıntı sorunu.* Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Eylül 22-24, Ankara, Türkiye.
9. **Maudens, K.E., Zhang, G., Lambert, W.E.** (2004) *Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection.* J. Chromatogr. A., 1047: 85-92.
10. **Reybroeck, W.** (2003) *Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market.* Apiacta, 38: 23-30.
11. **Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., Rice, S.** (2008) *Analysis and occurrence of sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis.* J. Agric. Food Chem., 56 (10): 3509-3516.
12. **şanlı, Y.** (1994) *Hayvan yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaç kullanımı ve çok yönlü sakıncaları.* Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim 13-14, Ankara, Türkiye.
13. **Uludağ, R.** (2008) *Ege Bölgesi'nde tüketime sunulan ballarda sülfonamid kalıntılarının araştırılması.* Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
14. **Verzegnassi, L., Savoy-Perroud, M.-C., Stadler, R.H.** (2002) *Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey.* J. Chromatogr. A., 977: 77-87.

Yazışma Adresi:

Dr. Yasemin COŞKUN
Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Toksikoloji Bölümü
35040 Bornova / İZMİR
e-mail: yasemincoskun71@gmail.com

DERLEME / REVIEW

İNGİLİZ ATLARINDA SAKATLIK NEDENLERİNE ANATOMİK YAKLAŞIMLAR

ANATOMIC APPROACHES ON REASON OF INJURIES IN THOROUGHBRED HORSES

İ. Gökçe YILDIRIM¹

Hasan ERDEN²

Geliş Tarihi (Received): 10.08.2011

Kabul Tarihi (Accepted): 04.11.2011

ÖZET

Bu makalede; İngiliz atlarında anatomik yapı kusurları ile hareket sistemi sakatlıklarının ilişkisi anatomik bir bakış açısı ile ele alınmıştır. Vücut yapı kusurları doğmasal ya da edinsel olarak şekillenebilmekte ve çok büyük oranda ekstremiteleri etkilemektedir. İntrauterin dönemde pozisyon hataları, beslenme hataları veya travma sonucu yapısal kusurlar oluşabilmektedir. İngiliz atlarında sakatlıklara neden olan başlıca anatomik kusurlar; sağrının normalden yüksek olması, bacak yapılarının vücut yapısıyla orantılı bir gelişim gösterememesi, *apparatus suspensoria* kusurları, *articulatio humeri* ve *articulatio metacarpophalangea* açılarının normalden daha geniş olmalarıdır. Tüm bu sakatlıklar anatomik yapı, tipi ve prognoz bakımından yaşa bağlı farklılık göstermektedir. Hatalı antrenman uygulamaları, uygun tırnak açılarının sağlanamaması ve tırnak uzunluğunun artması da bacak yapı kusurlarına neden olabilmektedir.

Anahtar kelimeler: At, beden yapısı, sakatlık.

SUMMARY

The aim of this review was to determine the relations between anatomic conformation problems and locomotor system injuries in Thoroughbred horses with anatomical perspective. Conformation problems may be congenital or acquired and affect the extremities to a large extent. The problem may occur in case of prenatal position failures, nutritional factors or trauma. Primary causes of the Thoroughbred injuries are higher croup, non-proportional leg growing defaults, abnormal *apparatus suspensoria*, abnormal angle of *articulatio humeri et metacarpophalangea*. All of this injuries show differences with the age, depending on anatomic structure, type of injury, and prognosis. Defaults of training, hoof trimming and long toes may cause leg conformation problems.

Key words: Body conformation, horse, injury.

GİRİŞ

Dünyada at yarışı endüstrisi her geçen yıl artarak büyümektedir (2). Grafik 1'de yer alan Türkiye Jokey Kulübü verilerinden, Türkiye'de yıllara göre yarışan at sayısındaki artışın büyüklüğü görülmektedir (22).

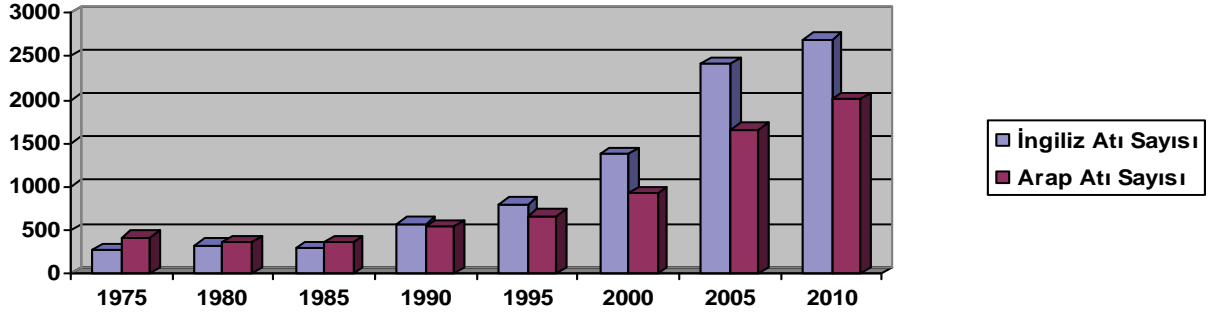
Bu atların sakatlıkları şüphesiz sektöre büyük zarar vermektedir (18). Yarış performansının uzun yıllar sakatlıklarla bölünmeden ya da sonlandırılmadan devam ettirilebilmesi önemlidir (2).

Atlarda tüm bacak sakatlıklarının % 46'sı tendo ve ligamentlere ilişkin olup (23), bu sakat-

lıklar % 80 gibi yüksek bir düzeyde tekrarlanabilirken, ancak atların % 20 kadarı hayatını sorunsuz devam ettirebilmektedir (5). Atlara ait sakatlıkların % 92.3'ünün sadece ön bacakta, % 4.6'sının arka bacakta, % 0.5'inin ise hem ön hem de arka bacakta görüldüğü bildirilmiştir (17). Cogger ve ark. (3), İngiliz atları üzerine yaptıkları sakatlık oranlarına ilişkin bir çalışmada *os metacarpale tertium* sakatlıklarının % 42.99, *articulatio metacarpophalangea* sakatlıklarının % 19.39, *articulatio carpi* sakatlıklarının da % 16.12 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar kısırkların geri dönüşümsüz sakatlıklara daha yatkın olduğunu göstermektedir (6).

¹Araş. Gör. Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi ABD, AYDIN.

²Prof. Dr. Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi ABD, AYDIN.



Grafik 1. Türkiye’de 1975–2010 yılları itibarıyla resmi yarışlara katılan at sayıları.

Graphic 1. Horse scores between 1975–2010 years in formal horse races in Turkey

METİN

Kusurlu vücut yapısı atı birçok sakatlığa yatkın hale getirirken, atın yarış hayatının kısılmasına ve damızlık değerinin kaybolmasına neden olmaktadır (1, 12, 19). Vücut yapı kusurları doğumsal ya da edinsel olarak şekillenebilmekte ve çok büyük oranda ekstremiteleri etkilemektedir (19). İntrauterin dönemde ağırlık merkezinin asimetric yüklenmeleri, beslenme hataları veya travma gibi etkiler sonucu yapısal kusurlar oluşabilmektedir (13). İngiliz atlarında sakatlıklara neden olan başlıca anatomik kusurlar; sağrının normalden yüksek olması (25), bacak yapılarının vücut yapısıyla orantılı bir gelişim gösterememesi (19), *apparatus suspensoria* kusurları (4, 8), *articulatio humeri* ve *articulatio metacarpophalangea* açılarının normalden daha geniş olmasıdır (26).

Ayakta duran bir atın ağırlık merkezi yaklaşık olarak 12. *costa*’nın orta noktalarına denk düşmelidir (26). Bu durumda atın ağırlığının % 60-65’i ön bacaklara yüklenir. Ancak İngiliz atlarında normalde cidago yüksekliğinden daha fazla olan sağrı yüksekliğinin daha da artması yaygın olarak görülen bir durumdur. Bu yapı kusuru, ağırlık merkezinin biraz daha öne kayarak ön bacaklara binen yükün artması ile sonuçlanır (25). Perkins ve ark.(17)’nin atlara ait sakatlıkların % 92.3’ünün ön bacakta görüldüğüne ilişkin tespitleri bu görüşü desteklemektedir. Atlarda bacağın herhangi bir bölgesinde görülen yapı kusuru bacağı bütünüyle etkilemektedir (16).

Atlarda bacak yapılarının vücut yapısı ile orantılı olmadığı durumlarda ön bacak kemik kırıklarının görülme sıklığı artmaktadır (13).

İngiliz atlarında *art. humeri* açısı normalde $101^\circ (\pm 5.05)$ olup (25), bu açının normalden büyük olması; *articulatio carpi*’nin osteochondral kırıklarına (13), önleri ileri bacak yapı kusuruna ve buna bağlı olarak da arpalamaya, flexor tendoların yanıklarına, *articulatio metacarpophalangea* ve *os naviculare* sakatlıklarına neden olmaktadır (7, 19).

Ayaklarda görülen yatık ya da dik bileklilik olgularında da patolojik değişiklikler görülebilmektedir. Yatık bileklilik kusuru olan bir atın yüksek hızlarda *articulatio metacarpophalangea*’sı aşırı derecede alçalarak *processus extensorius* kırıkları meydana gelebilmektedir (19). Bunun yanında, *articulatio carpi*’nin synovitis ve capsulitis olgularına yatkınlığı da artmaktadır (13). Yıldırım (25) tarafından yapılan tez çalışmasında, İngiliz atlarının Arap atlarına göre daha yatık bilekli bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Bu nedenle İngiliz atlarında *articulatio carpi* ve *articulatio metacarpophalangea* bölgesine ilişkin sakatlık riskinin Arap atlarına oranla daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Atlarda ön bacaklardaki düşey yükün yön değiştirdiği eklem olan *articulatio metacarpophalangea*’nin palmar yüzünde bulunan *apparatus suspensoria*’nın anatomik kusurlarının; *os sesamoidea proximalis* kırıkları, *ligamentum sesamoideum distale*’nin avulsiyon rupturları, *ligamentum suspensorium* kopmaları gibi atın yarış hayatını sonlandıran ya da ötenaziye neden olan sakatlıklar ile sonuçlanabildiği bildirilmektedir (4, 8).

Stove (20), atın yaşı ile sakatlık arasında ilişki olduğunu ve sakatlık riskinin altı aylıktan dört yaşına kadar her geçen yıl 1.2 kat arttığını belirt-

mektedir. Buna karşın Cogger ve ark. (3), İngiliz atlarında görülen hareket sistemi sakatlıklarının iki yaşlı taylarda üç yaşlılara oranla daha fazla olduğunu, Perkins ve ark. (17) da bu sakatlıkların en yüksek oranda iki yaşında ve en düşük oranda dört yaşında olduğunu belirtmektedir.

Intrauterin dönemde ağırlık merkezinin asimetrik yüklenmeleri, beslenme, trauma gibi etkiler bacak kusurlarına neden olabilmektedir. Bunun bir sonucu olarak tayların % 13'ünde ön bacaklarda angulasyon ve rotasyon görülebilmektedir (13).

Taylar doğuştan çukur dizli olup, art. carpi üç yaşına kadar yavaş bir şekilde normal pozisyonunu alır (13). Bacağın distal'indeki uzun kemiklerin gelişmelerinin 140. ve 210. günler arasında tamamlandığı (11, 21), buna karşılık bölgedeki eklemlerin normal yapısına ulaşmasının üç yaşını bulduğu bildirilmektedir (13). Bu veriler, üç yaşından önce art. carpi ve onun distal'inde yer alan eklemlerin gelişmelerini henüz tamamlamadığını ve yüklenmelere anatomik olarak hazır olmadıklarını göstermektedir. İngiliz atlarının iki yaşından itibaren yarıştırmaya başlandığı mevcut uygulamanın bu yönüyle yeniden değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

İngiliz atlarında yaşa bağlı bazı özel sakatlıklara duyarlılığın arttığı bildirilmektedir (20). Bir buçuk ve iki yaş arası hızlı antrenman temposuna giren atlarda *os metacarpale tertium*'ün dorsal yüzünde periostitis ve mikro kırıkların sık şekillendiği (19), iki yaşlı taylarda humerus ve tibia'nın stres kırıklarına sık rastlandığı (15), dört yaşından itibaren *apparatus suspansoria*'nın geri dönüşümsüz sakatlıklarının görülme riskinin daha fazla olduğu bildirilmektedir (20). Genç atlarda genellikle geri dönüşümsüz sakatlıklar görülürken (14), dört yaş sonrasında sıklıkla tekrarlayan tendo ve ligament kökenli sakatlıkların sık görüldüğü bildirilmektedir (17). Bu tendo ve ligament kökenli sakatlıkların dört yaş sonrasında sıklıkla tekrarlamasının ilgili dokuların esnekliğindeki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sakatlıklar anatomik yapı, tipi ve prognoz bakımından yaşa bağlı değişiklik göstermektedir.

Optimal tırnak açılarının sağlanamaması bacaklardaki anatomik oluşumlara gelen yükü değiştirir. Tırnak açılarının azalması *apparatus suspansoria* üzerindeki yükü arttırarak bu bölge sakatlıklarında hazırlayıcı rol oynar (9). Tırnak açısı daha fazla olan atlarda performans artarken,

sakatlıklar azalmaktadır (10). Atlarda tırnak uzunluğu arttıkça *articulatio carpi*'nin osteochondral kırık riskinin de arttığı dikkat çekmektedir (13). İngiliz yarış atlarındaki ön bacağa ilişkin alınan bazı ölçümlerden elde edilen değerler Arap atları ile karşılaştırıldığında İngiliz atlarının ön bilek yapılarının daha yatık olduğu görülmüştür (24). Bu durum, İngiliz atlarında tırnak kesimi yapılırken, tırnak açılarının küçültülmesinin sakatlık görülme riskinin artmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Tırnak kesimi kadar ayağın anatomisi üzerine etkili bir diğer unsur da nallamadır. İngiliz atlarında alüminyum toprak yüzü dar standart yarış nalları en yaygın kullanılan nallardır. Bu atlarda nal seçimi zemin ve atın ayak durumuna göre yapılmalıdır. Ortopedik nallama gereği *os naviculare* hastalığı ve laminitis'in tedavisinde ökçelerin yükseltilmesi kullanılan bir yöntemdir (19, 24). Burada amaç fleksör tendoların *os naviculare* ve *bursa podotrochlearis* üzerine yaptığı basıncı azaltmaktır. Bunun yanında zemine tutunmayı ve çıkış gücünü arttıran bir nal olan toe grabs bulunan nallar yarış atlarında *apparatus suspansoria*'nın dönüşümsüz sakatlıklarına yatkınlığı arttırır (8). Düz toprak yüzü nal ile toe grabs içeren nalların kullanımı arasında sakatlık riski 3.5 ila 15.6 kez artar (20). Bu duruma karşı toprak yüzünün dış kenarı yükseltilerek toe grabs'ın olumsuz etkileri aşılmaya çalışılmaktadır (20). İngiliz yarış atlarında ayak ve tırnak açılarının detaylı ölçümleri yapılarak sakatlıkların önüne geçilmeye çalışılmaktadır (9).

Sonuç olarak, İngiliz atlarında hareket sistemi sakatlıklarına neden olan anatomik yapı kusurları ile buna etkiyen faktörlere dikkat çekilmek suretiyle, sakatlık riskinin azaltılabilmesine bilimsel katkı ve koruyucu hekimliğin önemine vurgu yapılmak istenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Andersson, T.M., McIlwraith, C.W.** (2004) *Longitudinal development of equine conformation from weanling to age 3 years in the Thoroughbred*. Equine Vet. J., 36 (7): 563-570.
2. **Belloy, E., Bathe, A.P.** (1996) *The importance of standardising the evaluation of conformation in the horse*. Equine Vet. J., 28 (6): 429-430.
3. **Cogger, N., Evans, D.L., Hodgson, D.R., Reid, S.W., Perkins, N.** (2008) *Incidence rate of musculoskeletal injuries and determinants of time to recovery in young Australian Thoroughbred racehorses*. Aust. Vet. J., 86 (12): 473-480.

4. **Dayson, S.J., Arthur, R.M., Palmer, S.E., Richardson, D.** (1995) *Suspansory ligaments desmitis*. Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 11: 177-215.
5. **Dowling, B.A., Dart, A.J., Hodgson, D.R., Smith, R.K.W.** (2000) *Superficial digital flexor tendonitis in the horse*. Equine Vet. J., 32: 369-78.
6. **Estberg, L., Stover, S.M., Gardner, I.A., Johnson, B.J., Case, J.T., Ardans, A., Read, D.H., Anderson, M.L., Barr, B.C., Daft, B.M., Kinde, H., Moore, J., Stoltz, J., Woods, L.W.** (1996) *Fatal musculoskeletal injures incurred during racing and training in Thoroughbreds*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 208: 92-96.
7. **Finci, A.** (1998) *Spor Atı Yetiştirilmesi, Beslenmesi, Hastalıkları ve Tedavileri*. 49-57. Ofset Yayınevi, İstanbul.
8. **Kane, A.J., Stover, S.M., Gardner, I.A., Case, J.T., Johnson, B.J., Read, D.H., Ardans, A.A.** (1996) *Horseshoe characteristics as possible risk factors for fatal musculoskeletal injury of Thoroughbred racehorses*. Am. J. Vet. Res., 57: 1147-1152.
9. **Kane, A.J., Stover, S.M., Gardner, I.A., Bock, K.B., Case, J.T., Johnson, B.J., Anderson, M.L., Barr, B.C., Daft, B.M., Kinde, H., Larochelle, D., Moore, J., Mysore, J., Stoltz, J., Woods, L., Read, D.H., Ardans, A.A.** (1998) *Hoof size shape and balance as possible risk factors for catastrophic musculoskeletal injury of Thoroughbred racehorses*. Am. J. Vet. Res., 59: 1545-1552.
10. **Kobluk, C.N., Robinson, R.A., Gordon, B.J.** (1990) *The effect of conformation and shoeing: A cohort study of 95 Thoroughbred racehorses*. Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract., 35: 259-274.
11. **Magnusson, L.E.** (1985) *Studies on the conformation and related traits of standardbred trotters in Sweden*. Phd. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Skara.
12. **Mawdsley, A., Kelly, E.P., Smith, F.H., Brophy, P.O.** (1996) *Linear assessment of the Thoroughbred horse: An approach to conformation evaluation*. Equine Vet. J., 28 (6): 461-467.
13. **McIlwraith, C.W., Anderson, T.M., Sanschi, E.M.** (2003) *Conformation and musculoskeletal problems in the racehorse*. Clin. Tech. Equine Pract., 2 (4): 339-347.
14. **Mohammet, H.O., Hill, T., Lower, J.** (1992) *The risk of severity of limb injuries in racing Thoroughbred horses*. Cornel Vet., 82: 331-341.
15. **O'Sullivan, C.B., Lumsden, J.M.** (2003) *Stres fractures of the tibia and humerus in Thoroughbred racehorses: 99 cases (1992-2000)*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 222: 491-498.
16. **Parks, A.** (2005) *Foot balance and conformation: Clinical Perspectives*. British Equine Veterinary Association Congress Notes.
17. **Perkins, N.R., Reid, S.W.J., Morris, R.S.** (2005) *Risk factors for musculoskeletal injuries of the lower limbs in Thoroughbred racehorses in New Zealand*. New Zeal. Vet. J., 53 (3): 171-183.
18. **Riggs, C.M.** (1999) *Aetiopathogenesis of parasagittal fractures of the distal condyles of the third metacarpal and third metatarsal bones review of the literature*. Equine Vet. J., 31: 116-120.
19. **Stashak, T.S.** (1987) *The Relationship between conformation and lameness*. pp. 71. In: Stashak, T.S.(Ed): *Adam's Lameness in Horses*, 4th edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
20. **Stover, S.M.** (2003) *The epidemiology of Thoroughbred racehorse injures*. Clin. Tech. Equine Pract., 2 (4): 312-322.
21. **Thompson, K.N.** (1995) *Skeletal growth rates of weanling and yearling thoroughbred horses*. J. Anim. Sci., 73: 2513-2517.
22. **Türkiye Jokey Kulübü.** Erişim: www.tjk.org. Erişim Tarihi: 10.11.2011.
23. **Williams, R.B., Harkins, L.S., Hammond, C.J., Wood, J.L.N.** (2001) *Racehorse injures, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996,1997 and 1998*. Equine Vet. J., 33: 478-86.
24. **Wright, I.M., Douglas, J.** (1993) *Biomechanical considerations in the treatment of navicular disease*. Vet. Rec., 133: 109-114.
25. **Yıldırım, İ.G.** (2007) *Atlarda genel vücut yapısının morfolometrik yöntemlerle incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.
26. **Yücel, R.** (2005) *Atların Ortopedik Hastalıkları*. s.13-29. Akif Yayıncılık, Ankara.

Yazışma Adresi:

İ. Gökçe YILDIRIM
Adnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Anatomi Anabilim Dalı
09016 Işıklı / AYDIN
E-mail: gyildirim@adu.edu.tr

BORNOVA VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI

1. Dergi, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nün bilimsel yayın organı olup, yılda bir kez yayınlanır. Derginin kısaltılmış adı Bornova Vet. Bil. Derg.'dir.
2. Dergide, Türkçe ve yabancı dilde (tercihen İngilizce) hazırlanmış, tamamı yada bir kısmı daha önce başka bir yerde yayınlanmamış olan Veteriner Hekimlikle ilgili orijinal bilimsel araştırmalar, derlemeler, gözlemler ve Enstitü çalışmaları ile ilgili bilgiler yayımlanır. Derleme şeklindeki yazılar, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi ve klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir.
3. Yazılar A-4 (210x297 mm) formunda beyaz kağıda, çift aralıklı, kağıdın üstünden ve soldan 2,5 cm, sağdan ve alttan 2 cm boşluk bırakılarak ve 12 pt kullanılarak yazılmalıdır. Yazılar şekil ve tablolar dahil olmak üzere, orijinal makalelerde 15, derlemelerde 10 ve gözlemlerde 5 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, Microsoft Word programında yazılmalı ve orijinalinin yanı sıra iki adet kopyası ve disketi ile birlikte gönderilmelidir. Kopyalarda yazar adı ve yazara ait bilgiler bulunmamalıdır.
5. Tablo, şekil ve grafikler: Her tablo, şekil ve grafik, başlık ve dipnotları ile birlikte ayrı bir sayfaya çift aralıklı olarak ve rakam ile örnekteki gibi (Tablo 1, Tablo 2.....) metinde geçtiği sıraya göre yazılmalıdır. Tablolar mutlaka Word programında tablo eklentisi içinde yazılarak makale disketi içinde bulunmalıdır. Fotoğraflar siyah-beyaz, net ve parlak fotoğraf kağıdına basılmış olmalı (9 x 13 cm) yada bilgisayarda JPG, TIFF ve GIF formatında hazırlanmış şekli gönderilmelidir. Renkli fotoğraflar ve fotokopileri kabul edilmez.
6. Orijinal araştırma çalışmaları, konu başlığı, yabancı dilde başlık, yazar / yazarların adları, Türkçe özet ve anahtar kelimeler, yabancı dilde özet ve anahtar kelimeler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. Ayrıca metnin sonuna sayfa üst bilgisi için konuyu açıklayıcı birkaç kelimeden ibaret kısa bir başlık belirtilmelidir. Yabancı dilde yapılacak yayınlarda da aynı sıra takip edilmelidir.
7. **Konu başlığı**, kısa ve açık olmalı ve büyük harflerle Türkçe ve İngilizce olarak yazılmalıdır.
8. Yazar / yazarların ad ve soyadları, ünvan belirtilmeksizin yazılmalı ve yazar soyadlarına konacak rakamlar ile yazarların ünvanları, çalıştıkları kurum adresleri ve makale hakkında notlar birinci sayfanın en altında dipnot olarak belirtilmelidir.
9. **Özet**, Türkçe ve yabancı dilden 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalı ve alt kısımlarına Türkçe ve yabancı dilden anahtar kelimeler yazılmalıdır.
10. **Giriş** bölümünde çalışma ile doğrudan ilgili kısa literatür bilgileri verildikten sonra, son paragrafta çalışmanın amacı vurgulanmalıdır.
11. **Materyal ve Metot** bölümünde materyallerin nasıl ve ne şekilde toplandığı ve saklandığı ayrıntılı olarak yazılmalıdır. Bu bölümde, bilinen klasik metotlar için gereksiz ayrıntıya girmeden öz ve anlaşılır biçimde bilgi verilmeli, yeni yöntemler ise ayrıntılı şekilde açıklanmalıdır.
12. **Bulgular** araştırmanın niteliğine göre mantıklı bir sıra içinde verilmeli ve kısa bir şekilde açıklanmalıdır.
13. **Tartışma ve Sonuç** bölümünde veriler, konuyla ilgili diğer kaynaklardaki bulgular ile karşılaştırılmalı ve yorumlanmalıdır.
14. **Kaynaklar** bölümünde, yazı içinde yer alan tüm kaynaklar alfabetik sıraya göre yazılmalıdır. Metin içerisinde her kaynağa ait numara, ilgili olan cümlelerin sonunda parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak yazımında yazar adları kalın, yayın adı italik yazı karakteri ile

yazılmalıdır. Dergi adlarının kısaltılmasında “Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation” son baskısı esas alınmalıdır.

Sürelî Yayın:

Alterkuse, S.F., Hunt, J.M., Telleffson, L.K., Madden, J.M. (1995) *Food and animal sources of human Campylobacter jejuni infection*. J.A.V.M.A., 204 (1): 57-61.

Yazarlı kitap:

Stahr, H.M. (1977) *Analytical Toxicology Methods Manuel*. pp: 39-46. Iowa State Univ. Press, Ames, USA.

Editörlü Kitap:

Editörlü kitapta bölüm (önce yazar / yazarlar, alındığı bölüm ve sayfalar, daha sonra editör, alındığı kitap adı ,basımevi ve basımyeri) yazılmalıdır.

Popoff, M. (1984) *Aeromonas*. pp: 545 –546. In: Krieg, M.R., Holt, J. G. (Eds): *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore, London.

Kongre bildirisi:

Entrala, E., Mascaro, C. (1994) *New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, İzmir, Turkey.

Tez:

Türe, O. (1991) *Studies on the viral proteins of infectious bursal disease viruses*. Doktora Tezi, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.

15. Son sayfada yazara ve araştırmaya yardımcı olan kişi ve kuruluşlara ilişkin bilgiler ve teşekkür yazıları yer alabilir.
16. Gönderilen makalelere tüm yazarlar tarafından imzalanmış Telif Hakkı Devir Sözleşmesi eklenmelidir.
17. Hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda Etik Kurul Onayı aranır.
18. Dergide yayımlanan makaleler ile ilgili her türlü sorumluluk yazarlarına aittir. Yayın kurulunun yayımla ilgili kararı yazara/yazarlara bildirilir. Yayınlanması uygun olmayan yazılar yazara/yazarlara iade edilmez
19. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

GUIDELINES FOR THE JOURNAL OF BORNOVA VETERINARY SCIENCE

1. This journal is the scientific publication of the Izmir/Bornova Veterinary Control Institute Directorate which is published once a year. The designation of the journal is J. Bornova Vet. Sci.
2. In the journal, original scientific research papers, review articles, and case reports related to Veterinary Medicine and information related to the activities of the institute which are written in Turkish or in a foreign language (preferably in English) are published. The manuscripts, in part or as a whole should not have been previously published elsewhere. The review articles are accepted for publication only if they are original and consists of the latest developments and are not the repetition of the classical information.
3. The manuscripts should be written on a A4 type (210x297mm) white paper using double space and 12 pt letters. The margins should be as follows: 2.5cm from the top and the left side and 2 cm from the right side and the bottom of the page. Including the figures and the tables, the manuscripts should not exceed 15 pages for the original articles, 10 pages for reviews and 5 pages for the case reports.
4. The manuscripts should be written in Microsoft Word program and submitted one original and two copies along with a diskette that has the manuscript. The copies should not include the name of the author and any other information related to the author.
5. Tables, figures and graphs: Each table, figure and graph, along with their legends and footnotes should be written with double space as shown in the example (Table 1, Table 2) on a separate sheet according to the sequence they were used in the text. The tables must be prepared in table format of the Word program and should be included in the manuscript diskette. The photographs should be black and white and printed on a high quality glazed paper (9x13) or the JPG, TIFF and GIF formatted computer preparations should be sent. Color prints of the photographs or their copies are not accepted.
6. Original research papers; the title of the article in Turkish and in a foreign language, author/authors' names, summary in Turkish, keywords, summary in English and keywords, introduction, materials and methods, discussion and results, references should be prepared in this order. Also a short title describing the subject should be given at the end of the article for a running head at the top of the page. The same order should be followed in manuscripts that will be published in a foreign language.
7. **Title of the article:** It should be short, clear and written with capital letters in Turkish and in English.
8. The names of the author/authors should be written without mentioning their academic degrees. The academic degrees of the authors, the affiliations and work addresses and the notes about the article should be indicated as a footnote at the bottom of the first page by pointing the last name of the authors with different numbers.
9. **Summary:** It should be prepared in Turkish and in English and should not be more than 200 words. The keywords should be included at the end, both in Turkish and in English.
10. **Introduction:** In this section, a short literature information directly related to the work should be given and the objectives of the study should be emphasized at the last paragraph.
11. **Materials and Methods:** In this section, detailed information on how the materials were collected and stored should be written. The commonly used classical methods should be stated briefly and clearly without giving detailed information, however the new techniques should be described in detail.

12. **Results:** According to the nature of the research, the results should be presented in logical order and should be explained briefly.
13. **Discussion and Conclusion:** In this section, the data should be compared with the results of the other references related to the subject and interpreted accordingly.
14. **References:** The references that are cited in the text should be listed in alphabetical order. In the text, the number belonging to each reference should be cited in paranthesis at the end of the sentence. While forming the reference list, the names of the authors should be written in bold and the name of the reference in *italic* characters. For the designations of the journals, the latest edition of the Periodical Title Abbreviations; By Abbreviation should be referred.

Periodicals:

Alterkuse, S.F., Hunt, J.M., Tellefson, L.K., Madden, J.M. (1995) *Food and animal sources of human Campylobacter jejuni infection*. J.A.V.M.A., 204 (1): 57-61.

Book with Author:

Stahr, H.M. (1977) *Analytical Toxicology Methods Manuel*. pp: 39-46. Iowa State Univ. Press, Ames,USA.

Book with Editor:

In books with editor, the author/authors, the section and the pages that the information is taken, the editor, the book that this section belongs to, the publisher and the place to be printed should be written.

Popoff, M. (1984) *Aeromonas*. pp: 545-546. In: Krieg, M.R., Holt, J.G. (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore, London.

Congress Papers:

Entrala, E., Mascaro, C. (1994) *New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, Izmir, Turkey.

Thesis:

Türe, O. (1991) *Studies on the viral proteins of infectious bursal disease viruses*. Ph.D. Thesis, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.

15. Information and acknowledgements related to the people and institutions that helped to the author and to research can take place at the last page.
16. The papers must be submitted with a Copright Release Form signed by all authors
17. The scientific articles on animals must be submitted with an Ethic Committee approval.
18. All responsibilities on the papers published in the journal belong to the authors. The decision of the editorial board is notified to the author of the manuscripts. The papers that were not approved for publication are not returned to the author.
19. Copright fee is not paid to authors.

TELİF HAKKI DEVİR SÖZLEŞMESİ

Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi

Makalenin Başlığı:

.....
.....

Yazar/Yazarlar ve tam isimleri:

.....
.....
.....

Yayıncıdan sorumlu yazarın adı-soyadı, adresi ve iletişim bilgileri:

.....
.....
.....
.....

Biz aşağıda ad-soyad ve imzaları bulunan yazarlar, yukarıda başlığı belirtilen makalemizin tarafımızdan yapılmış özgün bir çalışma olduğunu, başka bir dergide yayınlanmadığını ve yayına sunulmadığını, bütün yazarların gönderilen makaleyi gördüğünü garanti ederiz ve makalenin tüm sorumluluğunu üstleniriz.

Aşağıdaki maddelerde belirtilen haklarımız saklı kalmak kaydı ile makalenin telif hakkını Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ve imza ederiz.

- Telif hakkı dışındaki patent hakları,
- Yazarların ders, kitap gibi çalışmalarında, sözlü sunumlarında ve konferanslarında makaleyi ücret ödemeksizin kullanabilmeleri,
- Satış amaçlı olmayan kendi faaliyetleri için makaleyi çoğaltmaları.

Bu belge tüm yazarlar tarafından imzalanmalıdır. Belgenin bağımsız kopyaları farklı kuruluşlarda bulunan yazarlar tarafından imzalanabilir. Fakat tüm imzalar özgün olmalıdır.

Yazarların Adı-Soyadı

İmza

Tarih

.....
.....
.....
.....
.....

Copyright Release
Journal of Bornova Veterinary Science

Manuscript title:
.....
.....

Full names of all authors:
.....
.....

Name, address and contact information of corresponding author:.....
.....
.....

We, the undersigned author/authors, warrant that the manuscript with the above mentioned title is an original work, has not been previously published and is not being submitted for publishing elsewhere, and that all authors have seen and approved the manuscript as submitted. We, all authors participated in the work, accept responsibility for releasing the work.

We, the undersigned author/authors, stipulate and sign that copyright of the above mentioned manuscript is transferred to Journal of Bornova Veterinary Science, effective on acceptance for publishing, except for all proprietary rights other than copyright, such as

- a) patent rights,
- b) to use, free of charge, this article for the author's future works in books, lectures or oral presentations,
- c) the right to reproduce the article for their own purposes, provided that the copies are not offered for sale.

This copyright form must be signed by all authors. Separate copies of the form may be submitted by authors located at different institutions. However, all signatures must be original.

Authors Name and Surname	Signature	Date
<hr/>		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		

DANIŐMA KURULU/ADVISORY BOARD

Prof. Dr. Ferda AKAR, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Yılmaz AKÇA, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Arif ALTINTAŐ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Kamil BOSTAN, İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. İbrahim BURGU, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN, Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakóltesi
Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĐLU, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Tayfun ÇARLI, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Meltem ÇETİN, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Bilal DİK, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Ahmet DOĐANAY, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Hasan EREN, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Ülker EREN, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Hüdaverdi ERER, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. İrfan EROL, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Ulvi Reha FİDANCI, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Ayhan FİLAZI, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Doç. Dr. Ergun Ömer GÖKSOY, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Doç. Dr. Uğur GÜNŐEN, Balıkesir Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksek Okulu
Prof. Dr. Merih HAZIROĞLU, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Rıfki HAZIROĞLU, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Zafer KARAER, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Sezai KAYA, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Kamil ÖCAL, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Aytekin ÖZER, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Edip ÖZER, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Ayhan ÖZKUL, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU, Mehmet Akif Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Őinasi UMUR, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Sibel YAVRU, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi

Enstitümüz Uzmanları DanıŐma Kurulunun diğer üyeleridir.

*İsimler soyadına göre alfabetik sırayla yazılmıştır.

