

Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi, Enstitünün bilimsel yayın organı olup, yılda bir kez yayınlanır. Derginin kısaltılmış adı Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg.'dir.

The Journal of Bornova Veterinary Control and Research Institute is the scientific publication of the institute, which is published once a year. The designation of the journal is J. of Bornova Vet. Cont. Res. Inst.

**Bornova Veteriner Kontrol ve
Araştırma Enstitüsü
Adına Sahibi**

Necdet AKKOCA
Enstitü Müdürü

Yayın Kurulu/Editorial Board

Dr. Öznur YAZICIOĞLU
Dr. Özhan TÜRKYILMAZ
Uzm. Vet. Hek. Necla TÜRK

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

Prof. Dr. Ferda AKAR
Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN
Prof. Dr. Tayfun ÇARLI
Dr. Fethiye ÇÖVEN
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Dr. Olcay TÜRE GÖKSU
Prof. Dr. Sezai KAYA
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU
Prof. Dr. Sibel YAVRU

*İsimler soyadına göre alfabetik sırayla yazılmıştır.

**Yazışma Adresi
(Correspondance Address)**

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
35010 Bornova / İZMİR
Tel: 0 (232) 388 00 10
Fax: 0 (232) 388 50 52
E-posta: bornova@bornovavet.gov.tr
Web site: <http://bornova.vet.gov.tr>
Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli

Bu dergi 1999 yılına kadar "Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi" adı ile yayımlanmıştır.

This journal was published with the name of "The Journal of Veterinary Control and Research Institute" until 1999.

BORNOVA VETERİNER KONTROL VE ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ DERGİSİ

*The Journal of
Bornova
Veterinary
Control and
Research Institute*

ISSN 1300-8307

Cilt/Volume: 32 Sayı/Number: 46 Yıl/Year: 2010

© Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitü Dergisi. Tüm hakları saklıdır / All rights reserved. TÜBİTAK-ULAKBİM ve CAB International'ın Yaşam Bilimleri Veritabanları kapsamında bulunan hakemli bir dergidir.

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

Basım Tarihi/ Publishing Date: Aralık 2010/ December 2010. Baskı Sayısı / Print Count: 500.

Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri

87 Sok. No. 4 / A Bornova

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

İzmir, Aralık - 2010

İÇİNDEKİLER

CONTENTS

Araştırma Makaleleri / Research Articles

Türkiye’de kullanılan canlı infeksiyöz bursal hastalığı (Gumboro) aşılarının patojenite düzeylerinin moleküler marker ile analizi

Analysis of the pathogenicity level of the live infectious bursal disease (Gumboro) vaccines used in Turkey by a molecular marker

Olca TÜRE GÖKSU, Sabahattin İÇİN, Hasan Hüseyin PALA

1

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virusunun (IPNV) üç farklı serotipine karşı tavşanlarda nötralizan antiserum üretimi

Production of neutralizing antisera against three different serotypes of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by injections of rabbits

Gülnur KALAYCI, Şerife İNÇOĞLU, Buket ÖZKAN ÖZYER

11

Akuakültür sektöründe artan antibiyotik dirençliliği ve insan sağlığına etkileri

The increase of antibiotic resistance in aquaculture and its effects on human health

Meriç Lütfi AVSEVER, Necla TÜRK, Serra TUNALIGİL

19

Türkiye’de yabani kuşlarda avian influenza virusunun (AIV) varlığı

The presence of avian influenza virus (AIV) in wild birds in Turkey

Fethiye ÇÖVEN, Özgür Keşaplı DIDRICKSON, Emre TEPEDELEN, Özge Keşaplı CAN, Can BİLGİN, Belgin AŞIKLAR, Hüseyin ATİK

25

Entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerindeki hayvanlardan izole edilen enterokokların fenotipik ve genotipik özellikleri üzerinde çalışmalar

Studies on phenotyping and genotyping characterization of *Enterococcus spp.* isolated from extensive broiler farms and rural poultry establishments

Zahide DİLİK, Ersin İSTANBULLUOĞLU

37

Olgu Raporu / Case Report

Arılarda bir karbamat pestisid olan karbarilin sebep olduğu zehirlenme olgusu

A poisoning case caused by carbaryl, a carbamate pesticide, in bees

Yasemin COŞKUN, Ahmet Turan ERDOĞDU, Murat YABANLI, Bilal ÖZ

47

Derleme / Review

Bakteriyel glikoproteinler

Bacterial glycoproteins

Erdem ÇİÇEK, Şükrü KIRKAN

51

TÜRKİYE'DE KULLANILAN CANLI İNFEKSİYÖZ BURSAL HASTALIĞI (GUMBORO) AŞILARININ PATOJENİTE DÜZEYLERİNİN MOLEKÜLER MARKER İLE ANALİZİ

ANALYSIS OF THE PATHOGENICITY LEVEL OF THE LIVE INFECTIOUS BURSAL
DISEASE (GUMBORO) VACCINES USED IN TURKEY BY A MOLECULAR MARKER

OlcaY TÜRE GÖKSU¹

Sabahattin İÇİN²

Hasan Hüseyin PALA²

Geliş Tarihi (Received): 02.06.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 25.06.2010

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'ye ithal edilerek sahada kullanılmakta olan farklı patojenik karakterdeki (intermediate, intermediate plus/hot) 23 adet canlı infeksiyöz bursal hastalığı (Gumboro/IBD) aşısı virusunun VP2 geninin 743bp'lik bölümü reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT/PCR) tekniğı ile çoğaltılarak *NgomIV* moleküler marker'ı ile analiz edildi. Çalışmada, *NgomIV* moleküler marker'ının VP2 geninin 284 pozisyonundaki alanine amino asitini içeren patojenik virusları, aynı noktada bu aminoasiti içermeyen attenuue aşısı suşlarından ayırt edebilme özelliğinden yararlanıldı. İntermediate (orta kuvvetli) sınıfta olduğu bilinen 13 attenuue aşısı suşunda 743 bp'lik bant *NgomIV* enzimi ile kesilmeyerek korundu. Hot/intermediate plus (kuvvetli) sınıfında olduğu bilinen 10 adet aşısı virusundan 9 adedinde 507bp ve 227 bp'lik iki bant oluştu. Patojenik özellikleri ile intermediate plus olduğu bildirilen Bursine Plus aşısına ait 743bp'lik bant *NgomIV* enzimi ile kesilmedi. Bu çalışmada, *NgomIV* marker analizi ile incelenen 23 adet Gumboro aşısından 22 adedinin protokol dosyasında bildirilen patojenik grubun özelliklerini taşıdığı görüldü. Bursine plus aşısına ait farklı sonucun literatür bilgileri ile çelişmediği görüldü.

Anahtar kelimeler: Aşısı, IBDV, moleküler marker, RT/PCR-RFLP.

SUMMARY

In this study, a 743bp fragment of the VP2 gene of 23 live infectious bursal disease (Gumboro/IBD) vaccine viruses with different pathogenic strength (intermediate, intermediate plus /hot) that are imported and used in the field of Turkey, was amplified by Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction (RT/PCR) technique and analyzed by the use of *NgomIV* molecular marker. In this study, the ability of *NgomIV* molecular marker to distinguish the pathogenic viruses which have the alanine amino acid at position 284 in the VP2 gene, from the attenuated vaccine strains that do not contain this amino acid at the same position, is utilized. The 743bp band of thirteen attenuated vaccine strains that are known to be in intermediate strength were not digested with *NgomIV* enzyme and remained uncut. Two bands of 507bp and 227 bp were formed in the 9 out of 10 vaccines viruses that are known for their hot/intermediate plus characteristics. 743bp band of Bursine plus vaccine which is reported to be an intermediate plus vaccine according to its pathogenic characteristics was not digested by *NgomIV* enzyme. In this study, it was observed that 22 of the 23 Gumboro vaccines that were examined by *NgomIV* marker analysis carried the pathogenic characteristics of those which were claimed in their protocol dossiers. The different result obtained with Bursine plus did not conflict with the literature.

Key words: IBDV, molecular marker, RT/PCR-RFLP, vaccine.

GİRİŞ

İnfeksiyöz bursal hastalığı (Gumboro-IBD) genç piliçlerin akut, çok bulaşıcı, viral ve immunsupresif bir hastalığı olup bursa Fabricius'un (BF) şiddetli yangısı ile karakterizedir (1, 4, 12). 1990'lı yıllarda tüm dünyada ve ülke-

mizde yüksek ölümlerle seyreden IBD salgınları yaşanmış, ancak son zamanlarda hastalık kontrol altına alınabilmiştir. Saha virusları ile mücadelede biyogüvenlik ve sanitasyon tedbirlerinin yanında aşılama büyük önem taşımaktadır. Özellikle çok virulent infeksiyöz bursal hastalığı virusunun (vvIBDV) neden olduğu salgınlar, iyi maternal

¹ Dr. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü, İZMİR.

² Uzm. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü, İZMİR.

korumaya sahip sürülerde serotip 1 grubu klasik antijenik yapıdaki intermediate veya hot/intermediate plus karakterdeki aşuların doğru yöntemle ve doğru zamanda uygulanması ile kontrol edilebilmektedir.

Ülkemizde kanatlı yetiştiricileri için, çeşitli uluslararası firmaların ürettiği farklı patojenik güçlerde (mild-zayıf, intermediate-orta, hot/intermediate plus-kuvvetli) canlı Gumboro aşısı seçenekleri bulunmaktadır. Gumboro aşısı dahil, ithal edilen tüm kanatlı aşuları kalite kontrol testleri için Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü, Kanatlı Aşuları Kontrol Laboratuvarına gelmektedir. İthal edilen aşılara ilgili yönetmelik ve genelgeler ile belirlenen kontrollerin yanısıra bazı durumlarda ileri tetkikler yapma gereği de doğmaktadır. Bu gereklilik sahadan şikayet üzerine olabildiği gibi, rutin kontroller sırasında yapılan gözlemler sonucu da olabilmektedir.

İnfeksiyöz bursal hastalığı aşısı viruslarının, ruhsat dosyasında belirtilen patojenik sınıfın özelliklerini taşıyıp taşımadığı moleküler marker analizi ile ortaya konabilmektedir. Jackwood ve ark. (10,11), patojenik ve attenuue IBD viruslarının nükleik asit sekanslarını inceleyerek, patojenik suşların VP2 geninin 284. pozisyonda bulunan alanine amino asitinin attenuue suşlarda threonine'e dönüştüğünü gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar, 284 pozisyonunda gerçekleşen amino asit değişikliklerinin, attenuue IBDV suşlarını patojen suşlardan ayırt etmekte kullanılabileceği hipotezini ortaya atmışlar ve bu amaçla VP2 geninin RT/PCR ürünündeki mutasyonu tanıyarak ayırt etmek üzere *NgomIV* restriksiyon enzimini seçmişlerdir (10). Bu hipotezi test etmek üzere, Jackwood ve ark. (10), *NgomIV* enzimini virulent olduğu bilinen 10 suş ve 16 attenuue aşısı suşu üzerinde incelemiş ve virulent suşları intermediate ve mild patojenitedeki aşısı suşlarından ayırt ettiklerini bildirmişlerdir.

Ülkemize ithal edilerek sahada kullanılan ve bu çalışma kapsamına alınan 23 adet canlı Gumboro aşısının 10 adedi hot/intermediate plus sınıfında, 13 adedi intermediate grupta yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı, *NgomIV* moleküler marker'ı kullanılarak ülkemize ithal edilen canlı infeksiyöz bursal hastalığı aşularının patojenik güçlerinin araştırılması ve ait oldukları patojenite sınıfının ortaya konmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

IBD Aşısı Virusları: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın izni ile ithal edilerek Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne kalite kontrol amacıyla gelen canlı IBDV aşısı Tablo 1'de listelenmiştir. 2006 ve öncesi, 2007 ve 2008 yıllarında gelen ve incelemeye alınan numuneler tabloda belirtilmiş ve bu aşılardan en az birer örnek olmak üzere toplam 52 aşısı numunesi 2 analiz tek-rarı ile incelenmiştir. Aşuların üretici ve ithalatçı firmaları ile ruhsat dosyalarında bildirilen patojenik karakteristikleri Tablo 1 ve 2'de belirtilmiştir. Toplam 23 canlı IBDV aşısı arasında *in ovo* uygulanabilen 2 adet hot suş içeren immunkompleks aşısı da (Bursa Plex, Cevac Transmune IBD) bulunmaktadır.

Primerler: İnfeksiyöz bursal hastalığı virusunun VP2 geninin 743 bp'lik bölümünü amplifiye eden 18 bp'lik primerler; 5-GCCCAGAGTCTACACCAT-3 (OLİGO 1) 5-CCGGATTATGTCTTTGA-3 (OLİGO 2) kullanıldı (7).

Restriksiyon Enzim: Jackwood ve ark. (10) tarafından attenuue IBDV aşularını daha patojenik olanlardan ayırt etmek için kullanılan *NgomIV* (Promega) enzimi, bu çalışmadaki aşısı viruslarının 743 bp'lik RT/PCR ürünlerinin moleküler karakterizasyonu amacıyla kullanıldı.

NgomIV enzimi kesim noktası aşağıda belirtilmiştir gibidir.

G[▼]CCGGC

CGGCC[▲]G

Metot

Viral RNA Ekstraksiyonu: İnfeksiyöz bursal hastalığı aşısı viruslarının RNA'ları, standart ekstraksiyon prosedürüne göre ekstrakte edildi (7, 9, 10, 17, 18). Kısaca aşular, 2 ml TNE buffer (10mM Tris HCl (pH 8.0) 100 mM NaCl ve 1 mM EDTA) ile sulandırılarak, eşit hacimdeki chloroform ile iki kez ekstrakte edildikten sonra, sırasıyla % 0.5 ve 1.0 mg/ml final konsantrasyonlardaki sodium

Tablo 1. Türkiye’de Kullanılan Canlı IBDV Aşı Bilgileri.

Aşı Adı	İthalatçı Firma	Üretici Firma	Aşı Numunesinin Ait Olduğu Yıllar			Aşının Bildirilen Patojenite Düzeyi
			2006 ve öncesi	2007	2008	
Bursine 2	Refarm	Fort Dodge, USA	+	+	+	Intermediate
Bursine Plus	Refarm	Fort Dodge, USA	+	+	+	Intermediate Plus
Bursa Plex	Refarm	Embrex, Inc ,USA	+	-	+	Hot Suş İçeren İmmunkompleks Aşı
Cevac Gumbo L	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	+	+	-	Intermediate
Cevac Bursa L	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	+	-	-	Intermediate
Cevac IBD L	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	+	+	+	Hot
Cevac Transmune IBD	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	-	+	+	Hot Suş İçeren İmmunkompleks Aşı
Bur 706	RTA	Rhone Merieux, Fransa	+	-	-	Intermediate
Gallivac IBD	RTA	Rhone Merieux, Fransa	-	+	+	Intermediate
Gallivac IBD H 2512	RTA	Merial Select, USA	+	+	+	Intermediate Plus
Tad Gumboro Vac Forte	Avimedica	Lohmann Animal Health, Almanya	+	+	+	Intermediate
Bursal Disease Vaccine	Avimedica	Vineland, USA	+	-	-	Intermediate
Hipragumboro CH 80	Hipra Vet	Hipra Lab., İspanya	+	+	-	Intermediate
Hipragumboro GM 97	Hipra Vet	Hipra Lab., İspanya	+	+	+	Hot
Iba Vac ST	Güneşli	Fatro-Neuva	+	+	+	Intermediate Plus
Iba Vac	Güneşli	Fatro-Neuva	+	+	+	Intermediate
Nobilis Gumboro Broiler	İntervet Türkiye	Intervet Hollanda	+	-	-	Intermediate
Nobilis Gumboro D78	İntervet Türkiye	Intervet Hollanda	+	+	+	Intermediate
Nobilis Gumboro 228E	İntervet Türkiye	Intervet Hollanda	+	+	+	Hot
Tabic MB	Polimed	Abic, İsrail	+	+	+	Intermediate Plus
Bursa Vac	Sanita	Schering Plough Animal Health, USA	+	+	+	Hot
Univax BD	Sanita	Schering Plough Animal Health, USA	+	-	-	Intermediate
Manisa D78	Manisa THAE	Manisa THAE	+	-	-	Intermediate

dodecyl sulphate ve proteinase K ile muamele edilerek 37° C’lik su banyosunda bekletildi. Örnekler eşit hacimdeki acid phenol (pH 4.3) ve sonra chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ile ekstrakte edildi. Viral RNA, 2 M 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 peletler kurutuldu ve 100 µl % 90’lık dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) ile süspanse edilerek -20° C’de saklandı.

RT/PCR Analizi: İnfeksiyöz bursal hastalığı aşısı viruslarının RT/PCR analizinde klasik metot kullanılarak 743 bp’lik VP2 geni amplifiye edildi (7, 9, 10, 17, 18). Kısaca; DMSO içindeki her RNA örneğinden 2ul’lik miktar alınarak 95° C’de 5

Tablo 2. IBDV Aşılarının Protokol Dosyasında Bildirilen Patojenite Düzeyleri ile NgoMIV Marker Analizi Sonucundaki Karşılaştırmalı Patojenite Düzeyleri.

Aşı Adı	İthalatçı Firma	Üretici Firma	Protokol Dosyasında Bildirilen Patojenite Düzeyi	NgoM IV Marker Analizi Sonucunda Bulunan Patojenite Düzeyi
Bursine 2	Refarm	Fort Dodge, USA	Intermediate	Intermediate
Bursine Plus	Refarm	Fort Dodge, USA	Intermediate Plus	Intermediate*
Bursa Plex	Refarm	Embrex, Inc ,USA	Hot Suş İçeren İmmunkompleks Aşı	Hot
Cevac Gumbo L	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	Intermediate	Intermediate
Cevac Bursa L	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	Intermediate	Intermediate
Cevac IBD L	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	Hot	Hot
Cevac Transmune IBD	Ceva DİF	Cevac Phylaxia, Macaristan	Hot Suş İçeren İmmunkompleks Aşı	Hot
Bur 706	RTA	Rhone Merieux, Fransa	Intermediate	Intermediate
Gallivac IBD	RTA	Rhone Merieux, Fransa	Intermediate	Intermediate
Gallivac IBD H 2512	RTA	Meril Select, USA	Intermediate Plus	Intermediate Plus
Tad Gumboro Vac Forte	Avimedica	Lohmann Animal Health, Almanya	Intermediate	Intermediate
Bursal Disease Vaccine	Avimedica	Vineland, USA	Intermediate	Intermediate
Hipragumboro CH 80	Hipra Vet	Hipra Lab., İspanya	Intermediate	Intermediate
Hipragumboro GM 97	Hipra Vet	Hipra Lab., İspanya	Hot	Hot
Iba Vac ST	Güneşli	Fatro-Neuva	Intermediate Plus	Intermediate Plus
Iba Vac	Güneşli	Fatro-Neuva	Intermediate	Intermediate
Nobilis Gumboro Broiler	İntervet Türkiye	Intervet Hollanda	Intermediate	Intermediate
Nobilis Gumboro D78	İntervet Türkiye	Intervet Hollanda	Intermediate	Intermediate
Nobilis Gumboro 228E	İntervet Türkiye	Intervet Hollanda	Hot	Hot
Tabic MB	Polimed	Abic, İsrail	Intermediate Plus	Intermediate Plus
Bursa Vac	Sanita	Schering Plough Animal Health, USA	Hot	Hot
Univax BD	Sanita	Schering Plough Animal Health, USA	Intermediate	Intermediate
Manisa D78	Manisa THAE	Manisa THAE	Intermediate	Intermediate

* RT/PCR-NgoMIV analizi sonucu protokol dosyasında bildirilen patojenik özellikten farklılık gösteren aşı.

dak. denatüre edildi. Primer olarak, VP2 geninin 743 bp'lik fragmentini amplifiye eden primer çifti kullanıldı (7). 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', Tıb Molbiol, GmbH), 25 mM MgCl₂, Recombinant Rnasin (RNase inhibitörü, 40U) (Promega), M-MLV Reverse transcriptase (200U) (Promega) içeren RT reaksiyon karışımı içinde thermal cyclers'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 polimeri-

zasyon süreleri uygulanarak gerçekleştirildi (7). 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 bulunan DNA moleküler ağırlık standardı (MA) (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) ile karşılaştırılarak kontrol edildi ve jel fotoğrafları (Vilber Lourmat, Infinity 115) çekildi.

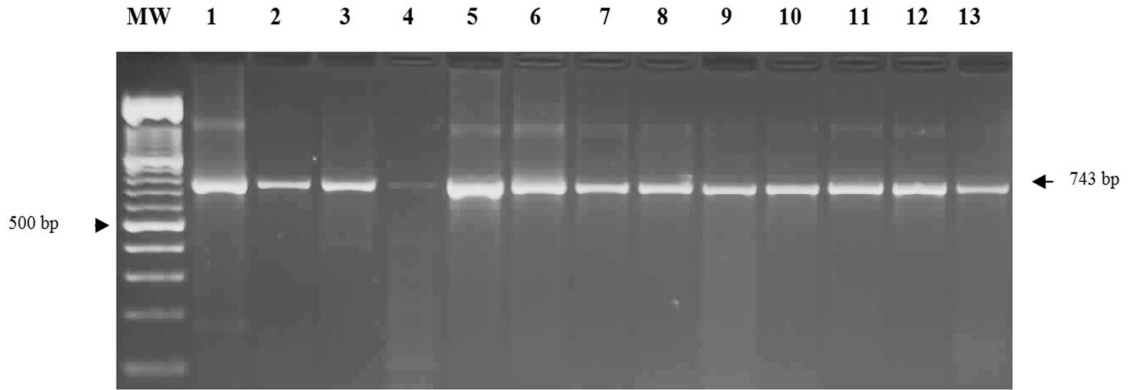
NgomIV Moleküler Marker Analizi: Amplifiye edilen 743bp'lik cDNA'lar NgomIV moleküler marker'ı ile enzimatik reaksiyona sokularak Jackwood ve ark. (10)'nın bildirdiği yöntemle incelendi. Sekiz µl RT/PCR ürününe NgomIV enziminden 1 µl (Promega, konsantrasyonu: 10 µ/µl), üretici firma tarafından sağlanan 10 X Buffer'dan (Promega) 2 µl, acethylated bovine serum

albumin'den (BSA) 0.2 µl ve 8.8 µl % 0.1'lik diethyl pyrocarbonate (Sigma) su ilave edildi. Reaksiyon tüpü 37° C'de 1 saat su banyosunda inkübe edildi. Enzim ile kesilmiş olan aşılara ait cDNA ürünleri % 2.5'lük agarose (Nu Micropor, Prona) jelde elektroforez edildi ve ethidium bromide (Sigma) ile boyama sonucunda bantlar UV transilluminatörde (Vilber Lourmat, Infinity 115) gözlenerek fotoğraflandı.

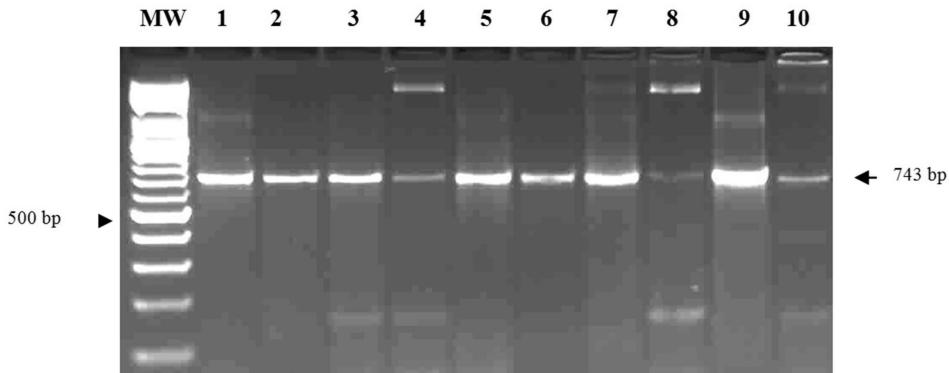
BULGULAR

RT/PCR Sonuçları

İntermediate karakterdeki Gumboro aşısı suşlarının RT/PCR ürünleri Şekil 1'de (1-13), hot/intermediate plus aşısı suşlarının RT/PCR ürünleri Şekil 2'de (1-10) sunulmuştur. Tüm aşılarda RT/PCR testinde VP2 geninin 743bp'lik bölümü amplifiye edildi.



Şekil 1. İntermediate IBDV Aşılarının RT/PCR Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1) Tad Gumboro Vac Forte; 2) Bursal Dis.Vac.; 3) Cevac Bursa L; 4) Cevac Gumbo L; 5) Iba Vac; 6) Hipragumboro CH80; 7) Nobilis Gumboro D78; 8) Nobilis Gumboro Broiler; 9) Bursine 2; 10) Gallivac IBD; 11) Bur 706; 12) Univax BD; 13) Manisa D78 aşılarda ait 743 bp VP2 geni



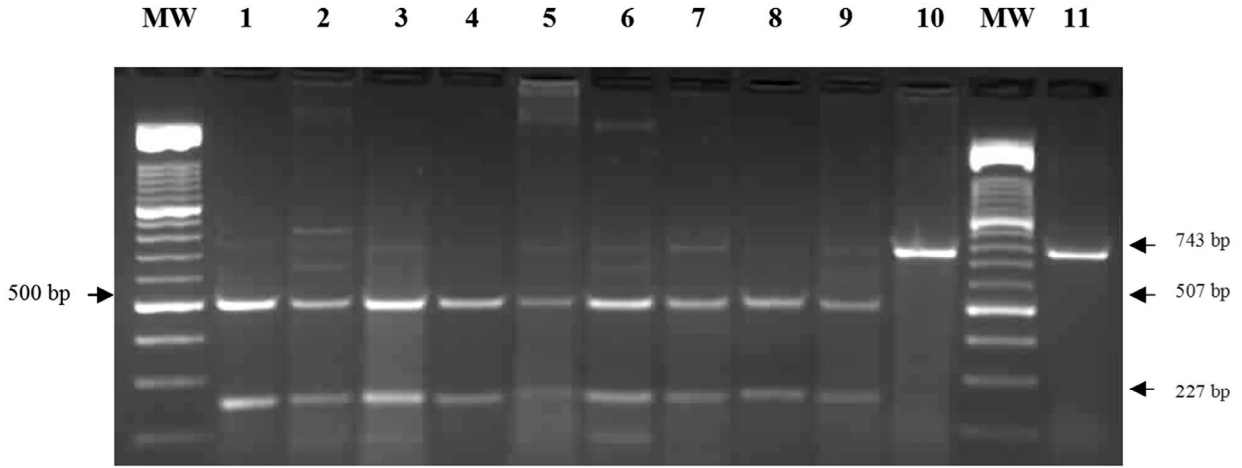
Şekil 2. Hot/Intermediate Plus IBDV Aşılarının RT/PCR Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1) Nobilis Gumboro 228E; 2) Hipragumboro GM97.; 3) Cevac IBD L; 4) Cevac Transmune IBD; 5) Iba Vac ST; 6) Gallivac IBD 2512; 7) Tabic MB; 8) Bursa Vac; 9) Bursine Plus; 10) Bursaplex aşılarda ait 743 bp VP2 geni

***Ng*oMIV Marker Analizi Sonuçları**

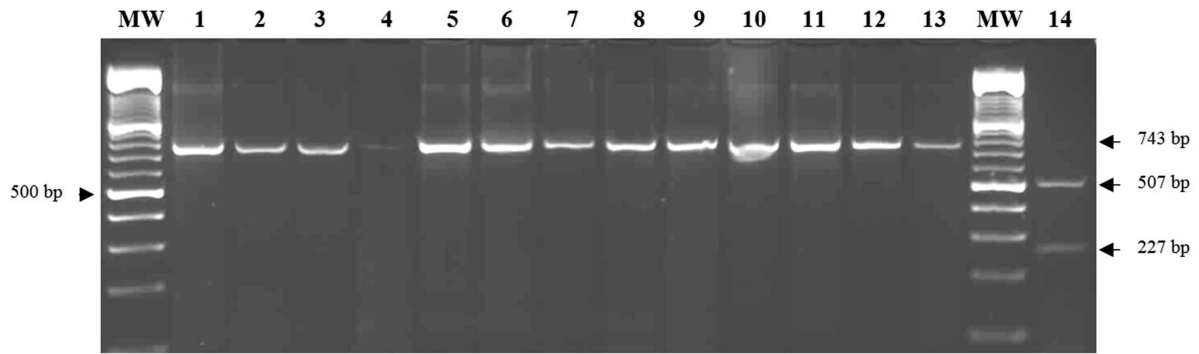
İncelenen IBDV aşılarının protokol dosyasında bildirilen patojenite düzeyleri ile *Ng*oMIV marker analizi sonucundaki patojenite düzeyleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2’de verilmiştir. Bu çalışmada, 23 adet Gumboro aşısından 22 adedinin protokol dosyasında bildirilen patojenik grubun özelliklerini taşıdığı görüldü. Sadece, intermediate plus olduğu bilinen Bursine plus aşısı *Ng*oMIV marker analizi sonucunda intermediate aşılardan gibi sonuç verdi.

Hot/intermediate plus karakterde 10 adet Gumboro aşısı suşunun 743 bp’lik RT/PCR ürünününün *Ng*oMIV enzimi ile kesilmesi sonucunda

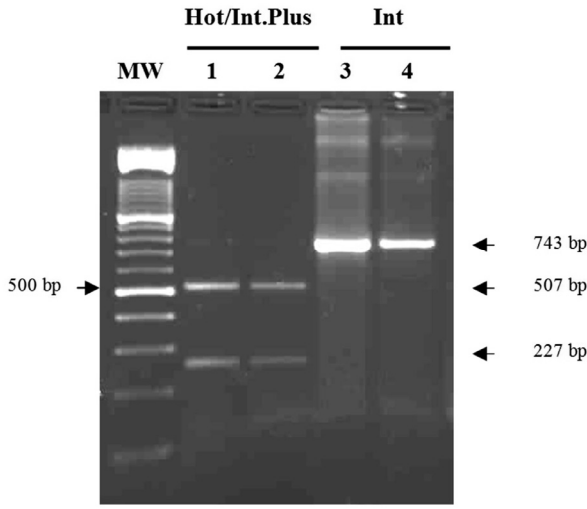
507 ve 227 bp’lik gen bantları oluştu. Aynı çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan intermediate suşu Nobilis Gumboro D78 (11) *Ng*oMIV enzimi ile kesilmedi. Bu çalışmanın sonuçları Şekil 3’te gösterilmiştir. Intermediate karakterdeki 13 adet Gumboro aşısı suşu *Ng*oMIV enzimi ile kesilmeyerek 743 bp’lik bant korundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan hot/intermediate plus suşu IBA Vac ST (14) *Ng*oMIV enzimi ile kesilerek 507 ve 227 bp’lik 2 gen bantına ayrıştı. Bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4’te gösterilmiştir. Intermediate ve hot/intermediate plus patojenik grupları temsilen seçilen 2 aşısı suşu ile enzim çalışmasını yansıtan bir jel fotoğrafı Şekil 5’te sunulmuştur.



Şekil 3. Hot/Intermediate Plus IBDV Aşılarının *Ng*oMIV Marker’ı ile Analiz Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1) Nobilis Gumboro 228E; 2) Hipragumboro GM97.; 3) Cevac IBD L; 4) Cevac Transmune IBD; 5) Iba Vac ST; 6) Gallivac IBD 2512; 7) Tabic MB; 8) Bursa Vac; 9) Bursaplex; 10) Bursine Plus 11) Intermediate pozitif kontrol virus; (Nobilis Gumboro D78)



Şekil 4. Intermediate IBDV Aşılarının *Ng*oMIV Marker’ı ile Analiz Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık standardı; 1) Tad Gumboro Vac Forte; 2) Bursal Dis.Vac.; 3) Cevac Bursa L; 4) Cevac Gumbo L; 5) Iba Vac; 6) Hipragumboro CH80; 7) Nobilis Gumboro D78; 8) Nobilis Gumboro Broiler ; 9) Bursine 2; 10) Gallivac IBD; 11) Bur 706; 12) Univax BD; 13) Manisa D78 aşısı 14) Hot/Intermediate Plus pozitif kontrol virus (Iba Vac ST)



Şekil 5. Hot/Intermediate Plus ve Intermediate IBDV Aşılarının NgoMIV Marker'ı ile Analiz Sonuçları. MW: 100bp moleküler ağırlık 1) Hipragumboro GM97, 2) Nobilis Gumboro 228E, 3) Iba Vac, 4) Nobilis Gumboro D78

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının VP2 geninin değişken sekans bölgeleri RT/PCR testi amplifiye edilerek suşlar arasındaki fenotipik farklılıklar restriksiyon enzim çalışmaları ile ortaya konabilmektedir (3, 5-10, 14, 15, 18).

İnfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının VP2 geninin nükleik asit sekans analizi çalışmalarında 284 pozisyonundaki amino asitin viral attenüasyon ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (10, 11, 13, 16, 19). Jackwood ve ark. (10, 11), patojenik ve attenué IBD viruslarının nükleik asit sekanslarını karşılaştırmışlar ve patojenik suşların VP2 geninin 284. pozisyonunda yer alan alanine amino asitinin attenué suşlarda threonine'e dönüştüğünü gözlemişlerdir. Lim ve ark. (13), VP2 genine 279 ve 284 pozisyonlarında uyguladıkları nokta hedefli mutagenesis sonucu 279. pozisyonundaki amino asitin aspartic asitten asparagine'e (Asp->Asn), 284. pozisyonundaki amino asitin alanine'den threonine'e (Ala->Thr) dönüştüğünü bulmuşlardır. Bu dönüşüm sonucunda, önceden hücreye adapte olmamış ve çoğalmayan patojen IBD viruslarının hücre kültüründe ürediğini gözlemişlerdir. Diğer bir çalışmada Qi ve ark. (19), Gx suşunun kör hücre pasajıyla attenuasyonu sonucu doğal olarak mutasyona uğradığını ve ortaya çıkan Gt suşunun 253 ve 284 pozisyonlarında amino asit değişikliklerinin meydana geldiğini bulmuşlar ve iki noktanın virusun

virulensi ile ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır. Mundt (16), 253 (Glu->His) ve 284 (Ala->Thr) pozisyonundaki amino asit değişikliklerinin varyant Del E suşunun hücre kültüründe çoğalması ile sonuçlandığını bildirmiştir. GLS suşunda sadece 284. pozisyonunda Ala->Thr'e dönüşmesi hücre kültüründe çoğalması için yeterli olmuştur.

Jackwood ve ark. (10), 284 pozisyonunda gerçekleşen amino asit değişikliklerinin, attenué IBDV suşlarını patojen suşlardan ayırt etmekte kullanılabileceğini bildirmişler ve bu amaçla VP2 geninin RT/PCR ürünündeki mutasyonu tanıyarak ayırt edebilecek NgoMIV restriksiyon enzimini seçmişlerdir. NgoMIV enzimi 5'GCCGGC-3' baz dizisini tanımaktadır. İlk üç baz (GCC) alanine amino asitinin kodonunu oluşturmaktadır (10). Attenué aşı suşlarında bu baz dizisinin birinci bazında ACC olarak bir değişiklik olmakta ve kodon threonine amino asitine dönüşmektedir (10). Attenuasyon sonucu gelişen bu mutasyonda, NgoMIV enzim kesim noktası ortadan kalktığı için, 284 pozisyonunda alanine amino asitini bulunduran patojen suşları diğerlerinden ayırmak için bir moleküler marker olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (9, 10). Bu hipotezi test etmek üzere, Jackwood ve ark. (10), NgoMIV enzimini virulent olduğu bilinen 10 suş ve 16 attenué aşı suşu üzerinde incelemiş ve virulent suşları intermediate ve mild patojenitedeki aşı suşlarından ayırt ettiklerini bildirmişlerdir. Daha sonra yürüttükleri bir çalışmada virulent olduğu bilinen 2 aşı virusunu (IBD Blen, Bursa Vac) aynı marker enzim ile analiz etmişler ve virulent aşı viruslarında da patojenik saha viruslarında olduğu gibi bu enzim için kesim noktasının bulunduğunu gözlemişlerdir (9).

Bu çalışmada 2006 yılı ve öncesinde, 2007, 2008 yıllarında rutin kalite kontrol amacıyla gelen numuneler arasından seçilen çeşitli firmalara ait 13 intermediate, 10 intermediate plus/hot karakterde olmak üzere toplam 23 Gumboro aşı virusu yer almıştır. Bu aşılarda in ovo uygulanabilen 2 adet hot suş içeren immunkompleks aşı da (Bursaplex, Cevac Transmune IBD) bulunmaktadır. İthal aşılarda yanında, geçmişte üretilen, ancak bugün üretimi devam etmeyen Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsüne ait Gumboro aşı suşu da (D78) çalışmada yer almıştır. Bazı aşılarda her üç yılda da ithal edilirken, bazılarının 2006 yılından sonraki yıllarda ithal

edilmediği veya daha önce ithal edilmeyenlerin ithal edilmeye başlandığı görülmüştür. Çalışmada, aşı ruhsat dosyalarında intermediate (orta) patojenitede olduğu bildirilen 13 adet Gumboro aşısının 743 bp'lik VP2 geni NgoMIV enzimi ile kesilmemiş ve attenuue aşı özelliğinde oldukları ortaya konmuştur. Bu sonuç, test edilen attenuue aşılarında 284. pozisyonda NgoMIV enzimi tarafından tanınacak baz dizisinin olmadığını göstermiştir. Elde edilen bulgu, Jackwood ve ark. (10), tarafından attenuue aşılar için bildirilen hipotezi destekler niteliktedir. Ruhsat dosyalarında hot/intermediate plus patojenitede olduğu bildirilen 10 adet Gumboro aşısının amplifiye edilen 743 bp'lik RT/PCR ürününün NgoMIV ile kesilmesi sonucunda 9 adedinde Jackwood ve ark. (9, 10)'nın da patojenik suşlarda gözlediği 507 ve 227 bp'lik gen bantları oluşmuştur. Attenuasyon düzeyi düşük olan bu aşılarında 284. pozisyonda NgoMIV enziminin tanıyacağı alanine amino asidine ait baz dizisinin halen korunduğu anlaşılmaktadır. Intermediate plus aşılarından sadece Bursine plus aşısının RT/PCR ürünü NgoMIV enzimi ile kesilmemiştir ve bu sonuç Jackwood ve ark. (10)'nın çalışmasında da benzer bulunmuştur. Bursine plus aşısına ait bültende, aşı virusunda bursa Fabricius'ta etkin üreyen patojenik virusların VP2 geninin 253. pozisyonunda bulunan amino asit dizisinin korunduğu, ancak attenuasyon ile mutasyona uğrayan 284 pozisyonundaki amino asit dizisinin korunmadığı bildirilmiştir (2). Jackwood ve ark. (10)'nın ve proje çalışmasının sonuçları bültendeki bildirimini doğrulamaktadır.

Jackwood ve ark. (10), 16 aşı virusunu kapsayan çalışmalarında Nobilis 228E aşısını intermediate grupta sınıflandırmışlardır. Ancak 228E suşu bu çalışmada farklı olarak hot/intermediate plus aşılar gibi sonuç vermiştir. Ruhsat dosyasında intermediate plus aşı olduğu bildirilen Nobilis 228E aşısının bu çalışmadaki sonucu bildirim ile paralel bulunmuştur. Araştırmacıların sonuçlarındaki farklılık, Amerika Birleşik Devletlerinde incelenen 228E aşısının üretiminde kullanılan suşun Türkiye'ye ithal edilen Nobilis 228E aşı virusundan attenuasyon bakımından farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, NgoMIV marker analizi ile incelenen çeşitli firmalara ait 23 Gumboro aşısından 21 adedinin ithal ön izin almak

üzere başvurdukları protokol dosyasında bildirilen patojenik grubun özelliklerini taşıdığı görülmüş, Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü tarafından geçmişte üretilmiş olan aşı suşunun (D78) intermediate karakterde olduğu teyit edilmiş ve Bursine plus isimli aşının VP2 geninin 284 pozisyonunda NgoMIV enzim kesim noktası bulunmadığı bulgusu bu çalışma ile teyit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu yayın, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen TAGEM/HS/14/01/08/137 kod'lu projeden hazırlanmıştır. Bu projenin yürütülmesine olanak sağlayan Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne ve projenin gerçekleştirilmesi sırasında destekleri için Enstitü Müdürü Necdet AKKOCA ile İdari Müdür Yardımcısı Hasan AKTAR'a teşekkür ederiz. Laboratuvar çalışmalarındaki lojistik katkı için Laborant Yavuz ÖZKAN ve Bülent DOĞAN'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Allan, W.H., Fragher, J.T., Cullen, G.A.** (1972) *Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease*. Vet. Rec., 90: 511-512.
2. **Anonim** (2007) *Bursine Plus*. Fort Dodge Animal Health Bülteni. S.6.
3. **Banda, A., Villegas, P., El-Attrache, J., Estevez, C.** (2001) *Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens*. Avian Dis., 45 (3): 620-630.
4. **Cosgrove, A.S.** (1962) *An apparently new disease of chickens – avian nephrosis*, Avian Dis., 6: 385-389.
5. **Eterradossi, N.** (2003) *Antigenic and genomic characterization of Turkish isolates of infectious bursal disease*. OIE, AFSSA, Report No: 020652.
6. **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.
7. **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.

8. **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.
9. **Jackwood D.J., Sommer S.E.** (2002) *Virulent vaccine strains of infectious bursal disease virus not distinguishable from wild-type viruses with the use of a molecular marker.* Avian Dis., 46: 1030-1032.
10. **Jackwood D.J., Byerley E.H., Sommer S.E.** (2001). *Use of a Genetic Marker for Wild-Type Potentially Pathogenic Infectious Bursal Disease Viruses.* Avian Dis., 45: 701-705.
11. **Jackwood D.J., Sommer S.E., Knoblich H.V.** (2001) *Amino acid comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular groups by RT/PCR-RFLP.* Avian Dis., 45 (2): 330-339.
12. **Kaufer, I., Weiss, E.** (1980) *Significance of bursa Fabricius as a target organ in infectious bursal disease of chickens.* Infect. Immun., 27: 364-367.
13. **Lim, B.L., Cao Y., Yu T., Mo C.W.** (1999) *Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2.* J. Virol., 73: 2854-2862.
14. **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.
15. **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.
16. **Mundt E.** (1999) *Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2.* J. Gen. Virol., 80: 2067-2076.
17. **Türe Göksu O., Erturun H., Pala H.H.** (2007) *Türkiye’de izole edilen infeksiyöz bursal hastalığı saha viruslarının moleküler karakterizasyonu.* Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 29 (43): 5-16.
18. **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.
19. **Qi X., Gao Y., Qin L., Wang Y., Gao L., Wang X.** (2009). *Naturally occurring mutations at residue 253 and 284 in vp2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus.* Antiviral Res., 84 (3): 225-33.

Yazışma Adresi:

Dr. Olcay TÜRE GÖKSU
Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü
35010-Bornova, İZMİR
E-mail: olcaytg@gmail.com

İNFEKSİYÖZ PANKREATİK NEKROZİS VİRUSUNUN (IPNV) ÜÇ FARKLI SEROTİPİNE KARŞI TAVŞANLARDA NÖTRALİZAN ANTİSERUM ÜRETİMİ*

PRODUCTION OF NEUTRALIZING ANTISERA AGAINST THREE DIFFERENT SEROTYPES OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV) BY INJECTIONS OF RABBITS

Gülnur KALAYCI¹

Şerife İNÇOĞLU²

Buket ÖZKAN ÖZYER³

Geliş Tarihi (Received): 08.07.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 09.08.2010

ÖZET

İnfeksiyöz pankreatik nekrozis (IPN) özellikle salmonidlerin kontagiyöz, horizontal ve vertikal olarak bulaşan, persiste özelliğe sahip birnavirusların neden olduğu viral bir enfeksiyonudur. Hastalığın tanısında duyarlı hücre kültüründe virus izolasyonunu takiben, nötralizasyon test (NT), indirekfluoresan antikor test (IFAT) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi tekniklerle identifikasyonu yapılmaktadır.

Viral hemorajik septisemi (VHS) ve infeksiyöz hemapoetik nekrozis (IHN) ve Spring Viremia of Carp (SVC) gibi diğer viral balık hastalıklarının tanısında olası İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virus (IPNV)'unun diğer virusları baskılayıcı özelliğinin ortadan kaldırılması için örneklerin mutlaka IPNV antiserumu ile nötrale edilerek de ekilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada IPN hastalığının tanısında nötralizasyon testte ve ayrıca viral balık hastalıklarının tanısında yanlış negatif sonuçlar alınmasını engellemek amacı ile IPNV baskılayıcı etkisinin ortadan kaldırılması için kullanılmak üzere IPNV'unun üç farklı serotipine (Sp, Ab ve VR299) karşı antiserum üretilmiştir. Antiserum üretiminde farklı yöntemler ve adjuvantlar kullanılarak Sp, Ab ve VR299 serotiplerinin herbirine karşı yüksek titrede; diğer serotipler, sahadan izole edilen viruslar ve Viral hemorajik septisemi virusu (VHSV), infeksiyöz hemapoetik nekrozis virusu (IHN) ve Spring Viremia of Carp virusu (SVCV) ile çapraz reaksiyon vermeyen veya en az veren yöntem belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Adjuvant, antiserum, IPNV, tavşan.

SUMMARY

Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) is an acute, contagious, systemic disease of salmonid species that is caused by birnavirus. The disease is transmitted both horizontally and vertically within and between species. Laboratory diagnosis of IPN is based on the isolation of virus in susceptible cell cultures and identification of the agent by serum neutralisation test (NT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and indirect immunofluorescent antibody techniques (IFAT).

Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) has an suppressive effect on the causative agents of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS), Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) and Spring Viremia of Carp (SVC) diseases. Because of this; it is possible to obtain false negative results for other fish viruses. Therefore, it is necessary to make neutralisation with IPNV antisera for the isolation and identification of other fish viruses. The produced antisera are going to be used for the diagnosis of IPN disease by neutralisation test and to eliminate the suppressive effect of IPNV on causative agents of other viral fish diseases.

In this project, neutralising antisera against three different serotypes of IPNV (Sp, Ab and VR299) were produced by the injections of rabbits using different immunisation programmes and different adjuvants. The proper method was determined according to the titre of neutralizing antisera and results of cross reactions with different strains of IPNV, field isolates of IPNV and other fish viruses (VHSV, IHN and SVCV).

Key words: Adjuvant, antisera, IPNV, rabbit.

*TAGEM/HS/09/02/07/124 no'lu projeden özetlenmiştir.

¹ Dr. Uzm. Vet. Hekim, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR.

² Dr. Biyolog, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR.

³ Dr. Vet. Hekim, Viroloji Bölümü, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR.

GİRİŞ

İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) özellikle genç salmonidlerin çok kontagiyöz viral bir enfeksiyonudur (10, 26). Özellikle yavru balıklarda (fry ve fingerling) mortalite oranı yüksektir. İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virus (IPNV) levrek, çipura, kalkan, halibut, sarıkuyruk, yılanbalığı gibi deniz balıklarında da mortaliteye neden olabilmektedir (4, 18, 19). Hastalık dünya üzerinde geniş bir coğrafik alanda görülmekte olup; Kuzey ve Güney Amerika'da, Avrupa ve Asya'da yaygın seyretmektedir (3).

Hastalığın etkeni Birnaviridae familyasında yer alan çift iplikçikli RNA içeren IPN virusudur. A segmenti major kapsit proteini (VP2), non struktural proteini (NS) ve minör struktural proteini (VP3) kodlar. VP2 serotip spesifik antijenik epitopları içerir ve nötralizan antikörlerin indüklenmesinden sorumludur. Virusun Sp, Ab ve VR299 olmak üzere 3 majör serotipine ilaveten 7 serotipi daha olduğu bildirilmektedir (5, 11, 15). Hastalığın tanısında klinik enfekte ve asemptomatik balıklardan bluegill fry (BF-2), chinook salmon embryonic (CHSE-214), rainbow trout gonads (RTG-2) veya fathead minnow (FHM) hücre kültürlerinde virus izolasyonunu takiben ELISA, IFAT ve serum nötralizasyon test ile identifikasyon yapılmaktadır (2, 22).

1960'lı yıllardan itibaren poliklonal veya monoklonal antikörler kullanılarak nötralizasyon test ile salmonidlerden ve diğer deniz canlılarından IPNV'unun farklı serotiplerinin izolasyonu mümkün olmaktadır (5, 7, 12, 23).

Ulusal Referans Laboratuvar olan Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından düzenli olarak yapılan teşhis, izleme ve tarama çalışmaları, hastalığın ülkemizde yaygın olduğunu göstermektedir. IPNV tespit edilen tüm örneklerin IPNV antiserumu ile nötralize edilerek diğer viruslar yönünden izolasyon çalışmalarının yapılması nedeni ile fazla miktarda IPNV antiserumu kullanılmaktadır.

Bu araştırma ile ihtiyaç duyulan IPNV antiserumlarının üretilmesinde kullanılacak olan en uygun immunizasyon prosedürünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Viruslar: Çalışmada "Federal Research Centre for Disease of Animals-Insel Riems" Almanya'dan sağlanarak Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (BVKAE) Viroloji Bölümünde stoklanan IPNV'unun Sp, Ab ve VR299 serotipleri, AB Referans Laboratuvarı Danish Institute for Food and Veterinary Research, Danimarka'dan sağlanarak BVKAE Viroloji Bölümünde stoklanan IHNV, VHSV, SVCV ve BVKAE Viroloji Bölümü tarafından izole edilen ve AB Referans Laboratuvarı "Danish Institute for Food and Veterinary Research" Danimarka tarafından dizi analizi ile teyit edilen 10 adet Sp serotipi IPNV kullanılmıştır.

Çalışmada % 10 Fetal Calf Serum (Sigma) ve % 1 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (Biochrom) içeren EMEM (Sigma) vasatı kullanılarak hazırlanan 24 saatlik hücre kültürlerinde 15° C'de inkübe edilerek üretilen viruslar kullanılmıştır.

Hücre Kültürleri: Çalışmada Hücre Kültürleri Koleksiyonu (HÜKÜK), Şap Enstitüsünden sağlanarak BVKAE Viroloji Bölümünde stoklanan BF2 hücre kültürleri ve "Federal Research Centre for Disease of Animals-Insel Riems" Almanya'dan sağlanarak BVKAE Viroloji Bölümünde stoklanan EPC hücre kültürleri kullanılmıştır.

Hücre kültürleri, % 10 Fetal Calf Serum ve % 1 HEPES içeren EMEM vasatı kullanılarak üretilmiş ve 24° C'de soğutmalı inkübatörde inkübe edilmiştir.

Yeni Zelanda Tavşanları: BVKAE Deney Hayvanları Birimi'nde üretilen 3 aylık dişi Yeni Zelanda tavşanları kullanılmıştır. Her bir serotip için her bir immunizasyon yönteminde 3 tavşan olmak üzere çalışmada toplam 27 tavşan kullanılmıştır.

Adjuvant: Çalışmada Freund's Complete (FCA) ve incomplete adjuvant (FIA) lar (Sigma) kullanılmıştır.

Virus Konsantrasyonu: IPNV Sp, Ab ve VR299 serotiplerinin her birisi için üretilen viruslar

1500 x g'de 15 dakika 4° C'de santrifüj edilerek klarifiye edilmiş, süpernatant alınarak 90.000 x g'de (Beckman Coulter Optima LE-80K) 1 saat süre ile 4° C'de santrifüj edilmiştir. Peletler 0,01M tris, 0,1M sodyum chloride, 1M methyleneediaminetetra-acetic acid (TNE) tampon solüsyonunda çözdürülerek süspanse edilmiştir. Süspansiyon eşit miktarda 1,1,2 trichlorotrifluoraethane (Uvasol, Merck, Almanya) ile karıştırılmış ve tampon solüsyonunda 1500 x g'de 10 dakika santrifüj edilip üstteki sıvı faz alınmış ve işlem tekrarlanmıştır. TNE ile süspanse edilen peletler gece 4° C'de bekletildikten sonra spektrofotometrik (Unicam Helios Gama) ölçümü yapılarak protein konsantrasyonu belirlenerek -70° C'de stoklanmıştır (6).

Virus Purifikasyonu: IPNV Sp, Ab ve VR299 serotiplerinin herbiri için üretilen viruslar 1500 x g'de 15 dakika 4° C'de santrifüj edilerek klarifiye edilmiş, süpernatant alınarak 90.000 x g'de 1 saat süre ile 4° C'de santrifüj edilmiştir. Peletler 0.01M tris, 0.1M sodyum chloride, 1M methyleneediaminetetra-acetic acid (TNE) tampon solüsyonunda çözdürülerek süspanse edilmiştir. Süspansiyon eşit miktarda 1,1,2 trichlorotrifluoraethane (Uvasol, Merck, Almanya) ile karıştırılmış 1500 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı faz alınarak işlem tekrarlanmıştır. Peletler toplanarak linear sucrose density gradient (% 15-45) uygulanmış ve 45.000 x g'de 4° C'de 2 saat süre ile santrifüj edilmiştir. Süre sonunda virus içeren opak bantlar toplanarak TNE tampon solüsyonu ile dilüe edilmiş ve 90.000 x g'de 4° C'de 2 saat süre ile santrifüj edilmiştir. Peletler TNE tampon solüsyonunda çözdürülerek toplanmış ve bir gece 4° C'de bekletildikten sonra spektrofotometrik ölçümü yapılarak protein konsantrasyonu belirlenerek -70° C'de stoklanmıştır.

İmmünizasyon Yöntemleri: Her bir serotip için konsantre virus, purifiye 1 ve purifiye 2 olarak adlandırılan aşağıdaki 3 farklı immunizasyon yöntemi uygulanmıştır.

1. Konsantre virus

Konsantre virus (500 µg/tavşan) + FIA ile tavşanların im immunizasyonu, 4 hafta sonra çıplak virus (500 µg/tavşan) ile iv immunizasyonu, 7-10 gün sonra kan alımı.

2. Purifiye 1

Purifiye virus (500 µg/tavşan) + FCA ile tavşanların im immunizasyonu, 3 hafta sonra purifiye virus (500 µg/tavşan) + FIA ile tavşanların im immunizasyonu, 3 hafta sonra çıplak virus (500 µg/tavşan) ile iv immunizasyonu, 7-10 gün sonra kan alımı.

3. Purifiye 2

Purifiye virus (500 µg/tavşan) + FIA ile tavşanların im immunizasyonu, 3 hafta sonra çıplak virus (500 µg/tavşan) ile iv immunizasyonu, 3 hafta sonra çıplak virus (500 µg/tavşan) ile iv immunizasyonu, 7-10 gün sonra kan alımı.

Serumların Toplanması ve Stoklanması:

Her bir tavşandan 14-15 ml kan alınarak serumları ayrılmış ve aynı serotipin aynı immunizasyon prosedürü ile elde edilen serumları birleştirilerek 2000 x g'de 10 dakika süre ile santrifüjü takiben 56° C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra porsiyonlara ayrılarak -20° C'de stoklanmıştır.

Titrasyon: IPNV Sp, Ab ve VR 299 serotiplerinin, IPNV saha izolatlarının, VHS, IHN ve SVC viruslarının log10 tabanına göre dilüsyonları kullanılarak 24 saatlik hücre içeren doku kültürü tabletlerinde 5 göz/dilüsyon olacak şekilde mikrotitrasyonu yapılmıştır. Tabletler soğutmalı karbon-dioksitli (% 2.5) inkübatörde 7 gün süre ile inkübe edilmiş ve 7. gün Spaerman-Kaerber metodu kullanılarak titreler belirlenmiştir.

Serum Nötralizasyon Testi: IPNV Sp, Ab ve VR 299 serotiplerine karşı 3 immunizasyon yöntemi ile üretilen antiserumların her birine üretildikleri serotiplere karşı 24 saatlik hücre içeren doku kültürü tabletlerinde mikronötralizasyon test uygulanmıştır.

Mikronötralizasyon testte 100DKID₅₀/0,1 ml oranında virus ile 15° C'de bir saat nötralize edilen serumların 1/160-1/327680 dilüsyonlarını 4 göz/dilüsyon olarak içeren tabletler, 15 °C'de karbondioksitli (% 2.5) inkübatörde 7 gün süre ile inkübe edilmiş ve 7. gün Serum Nötralizasyon (SN₅₀) değerleri belirlenmiştir.

Aynı prosedür çapraz reaksiyonları belirlemek üzere üretilen her bir antiserum için diğer serotiplere, IHN, VHSV ve SVCV'a karşı da uygulanmıştır.

Serumların kullanım titreleri ile saha viruslarına karşı aynı nötralizasyon test prosedürü uygulanmıştır.

BULGULAR

Üretilen antiserumların nötralizan titreleri, birbirleri ile ve IHNV, VHSV ve SVCV ile çapraz reaksiyon verdikleri titreler Tablo 1’de verilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

IPN hastalığının tanısında ELISA, IFAT, nötralizasyon test kullanılması gereken standart

test metotlarıdır (3). İzole edilen virusların serotiplendirilmesinde de monoklonal veya poliklonal antiserum kullanılarak nötralizasyon test uygulanmaktadır (14, 20, 23, 27).

2006/88/EC (2) ve 2001/183/EEC (1) sayılı Avrupa Birliği Direktiflerinde ülkelerin enfekte ve enfekte olmayan bölgelerinin ve çiftliklerinin belirlenmesi amacı ile yapılması gereken viral balık hastalıkları izleme programlarında, IHN ve VHS gibi hastalıkların taramasında örneklerin IPNV antiserumu ile nötralize edilerek işlenmesi gerektiği bildirilmektedir.

Tablo 1. IPN antiserumlarının nötralizan titreleri ve çapraz reaksiyon titre sonuçları.

Virus	İmmünizasyon prosedürü	Nötralizasyon Titreleri (SN 50/0,1 ml)					
		Ab	Sp	VR299	IHN	VHS	SVC
IPNAb	Konsantre	10939	1234	446	-	-	-
IPNAb	Purifiye 1	57000	10000	48977	-	-	-
IPNAb	Purifiye 2	33113	6620	21777	-	-	-
IPNSp	Konsantre	3713	57543	3548	-	-	-
IPNSp	Purifiye 1	21877	100461	40960	-	-	-
IPNSp	Purifiye 2	3548	87498	28840	-	-	-
IPNVR299	Konsantre	1548	-	57676	-	-	-
IPNVR299	Purifiye 1	19054	74131	132434	-	-	-
IPNVR299	Purifiye 2	-	-	100461	-	-	-

Üretilen antiserumların SN₅₀ titreleri kullanılarak saha izolatlarına uygulanan nötralizasyon test sonuçları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. IPN antiserumlarının saha izolatlarına karşı nötralizan etkileri.

Saha izolatu	Konsantre			Purifiye 1			Purifiye 2		
	Ab 10939	Sp 57543	VR29957 576	Ab 57000	Sp 100461	VR299 132434	Ab 33113	Sp 87498	VR299 100461
Hatay	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Denizli	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Antalya	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Bolu	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Ankara	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Zonguldak	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Samsun	-	+	-	-	+	-	-	+	-
İzmir	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Düzce	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Bilecik	-	+	-	-	+	-	-	+	-

Nötralizasyon testinde yüksek titreli spesifik antikorların kullanılması gerekmektedir. Bunun için de karşılaştırmalı inokulasyon programları uygulanarak en iyi sonuç veren prosedürün seçilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. IPNV'una karşı niteliksel ve niceliksel özellik taşıyan antiserumların elde edilmesinin FCA ve FIA kullanımına bağlı olduğu bildirilmektedir. Enfekte hücre kültürü süpernatantları fazla miktarda çözünebilir antijen içermekte olduğundan inokulasyonlarda santrifüj ile konsantre edilen bir virusun kullanılması gerektiği bildirilmektedir (13). Antiserum üretiminde antijenin purifikasyonunun spesifik antikor üretimini artırdığı ve istenmeyen antikorların üretimini engellediği bildirilmektedir (16, 24, 25). Bu çalışmada da konsantre ve purifiye virus FCA ve FIA kullanılarak antiserum üretilmiştir. Çalışmada virusların konsantrasyonu Dixon ve Hill (6)'in bildirdiği protokole göre, purifikasyonu ise Dixon ve Hill (6)'in bildirdiği protokol modifiye edilerek yapılmıştır.

Antiserum üretiminde kullanılan hayvan türü ve antijen miktarı da önem taşımaktadır. Sanjuan ve ark. (24) IPNV'unun Ab, Sp serotiplerine karşı tavşan ve domuz kullanarak antiserum üretmişler ve tavşan kullanımının antiserum üretiminde daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Antijen miktarının çok az veya çok fazla olması supresyonu, sensitizasyonu, toleransı veya istenmeyen immunmodulasyonları indükleyebilir. Freund's adjuvantlar ile birlikte tavşana verilecek çözünebilir protein miktarının 50-1000 mikrogram olduğu bildirilmiştir (8, 16). Hattori ve ark. (9), IPNV VR299 serotipine karşı kobay ve tavşanlarda 500 µg/ kobay, 1000 µg/ tavşan purifiye antijen kullanarak, Mc Allister ve Schill (17) ise tavşanlarda 500 µg/ tavşan purifiye antijen kullanarak serum üretmişlerdir. Özyer ve Çağırğan (21), IPNV Ab, Sp ve VR299 serotiplerine karşı tavşanlarda 200 µg/ml, kobaylarda 100 µg/ml purifiye virus kullanarak antiserum üretmişlerdir. Tavşanlarda IPNV'unun Ab, Sp ve VR299 serotiplerine karşı 500'er µg/ tavşan FCA ve FIA ile konsantre ve purifiye antijen kullanılarak üç ayrı immunizasyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, niteliksel ve niceliksel özellik taşıyan antiserum üretiminde kullanılan adjuvantın yanısıra virusun konsantre veya purifiye olmasının da oldukça etkili olduğunu göstermiştir.

Antiserum üretiminde immunizasyon prosedürü de büyük önem taşımaktadır. Hill ve ark.

(13), IPNV'unun Sp serotipine karşı konsantre virus kullanarak tavşanlarda tek iv, birer hafta aralıklarla 4 kez iv, FIA ile im, 4 hafta sonra iv, hücre kültürü süpernatantı kullanarak FIA ile im, 4 hafta sonra iv, FIA ile im, 4 hafta sonra birer hafta aralıklarla 3 kez iv, purifiye virus kullanarak FIA ile im, 4 hafta sonra birer hafta aralıklarla 2 kez iv immunizasyon uygulamış, 7-10 gün sonra kanlarını almışlardır. Nötralizasyon test ile antiserumların titrelerini belirlemiş ve Ab ve VR299 serotiplerine karşı çapraz reaksiyonlarını araştırmışlardır. İlk immunizasyonda IgM'lerin oluştuğunu ve 10-14 günde maksimum düzeye ulaştıktan sonra düşmeye başladığını, bu nedenle ikinci iv immunizasyon ile IgG'lerin oluşumunun stimüle edilmesi gerektiğini, 4 iv immunizasyon ile maksimum düzeye ulaştığını belirtmişlerdir. Adjuvant kullanarak im primer stimülasyonu takiben 3-4 hafta sonra iv immunizasyon ile yüksek titreli antiserum elde edildiğini belirtmişlerdir.

Sanjuan ve ark. (24), Sp serotipine karşı konsantre virus ve FCA kullanarak tavşanda sc/iv, domuzda im /3 kez iv, Ab ve Sp serotipine karşı konsantre virus ve FIA kullanarak tavşanda im/iv, Ab ve Sp serotipine karşı süpernatant ve FIA kullanarak 2 kez im/ip immunizasyon uygulamış, 7-10 gün sonra kanlarını almışlardır. Nötralizasyon test ile antiserumların titrelerini belirlemiş ve Ab serotipine karşı çapraz reaksiyonlarını araştırmışlardır.

Hill ve ark. (13), Sanjuan ve ark. (24), FCA ve konsantre virus kullanılarak yapılan immunizasyonlarda FIA ve konsantre virus kullanılarak yapılan immunizasyonlardan daha yüksek titreli ancak serotiplerarası yüksek çapraz reaksiyon veren antiserumlar elde edildiğini bildirmişlerdir. Antiserumun spesifite değerinin yükseldikçe heterolog titrenin azaldığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında konsantre virus ile FIA adjuvantın im immunizasyonunu takiben bir veya iki kez iv immunizasyonu ile elde edilen antiserumların kullanıma en elverişli serumlar olduğu sonucuna varmışlardır.

Bu çalışmada da FCA kullanılan purifiye 1 immunizasyon yöntemi ile elde edilen antiserumların FIA kullanılan purifiye 2 ve konsantre immunizasyon yöntemi ile elde edilen antiserumlardan daha yüksek antikor titresine sahip olduğu ancak diğer serotipler ile daha yüksek çapraz reaksiyon verdiği görülmüştür. Ancak çalışmada IPNV'unun Ab, Sp ve VR299 serotiplerine karşı

üç immunizasyon yöntemi ile üretilen antiserumların IHN, VHS ve SVC viruslarına karşı çapraz reaksiyon vermediği görülmüştür. Bu serumlar IPNV'unun baskılayıcı etkisi nedeni ile diğer balık hastalıklarının özellikle VHS ve IHN enfeksiyonlarının tespiti için materyallerin IPN serumu ile nötralize edilmesinde kullanıma elverişli bulunmuştur.

Çapraz reaksiyonlar değerlendirildiğinde bu çalışmada da konsantre virus (500 µg/tavşan) + FIA ile tavşanların im immunizasyonu, 4 hafta sonra çıplak virus (500 µg/tavşan) ile iv immunizasyonu ile elde edilen antiserumların hem diğer serotipler ile çapraz reaksiyonlarının düşük olması hem de diğer balık virusları ile çapraz reaksiyonlarının bulunmamasından dolayı kullanıma en elverişli antiserumlar olduğu görülmüştür.

Üretilen poliklonal antikorlar spesifik tek bir antikora karşı olmayıp, farklı epitoplara karşı üretilen antikorların karışımını içermektedir. Bu kompozisyon antikor üretiminde kullanılan bireyler arasında fizyolojik, genetik ve bireysel faktörlerden kaynaklanan epitop spesifik antikor oranlarında farklılıklara yol açmaktadır. Bu nedenle de poliklonal antikorların standardizasyonu kolay olmamakta ve aynı antijene karşı farklı bireylerde üretilen poliklonal antikorların bir epitop veya epitoplar kümesini tanıma özellikleri önemli ölçüde farklı olabilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı da birbiri ile yakın ilişkili antijenlere karşı üretilen poliklonal antikorlar monoklonal antikorlardan daha fazla çapraz reaksiyonlara yol açmaktadır (20).

Bu çalışmada farklı immunizasyon yöntemleri ile üretilen antiserumların diğer serotiplere karşı çapraz reaksiyonlar oluşturmasında antikor üretiminde kullanılan bireyler arasındaki fizyolojik, genetik ve bireysel faktörlerin de kısmen etkili olabileceği düşünülmektedir.

Sanjuan ve ark. (24), Rodriquez ve ark. (23) ürettikleri antiserumları kullanarak nötralizasyon test ile saha materyallerinde IPNV'unun teşhisi ve serotiplendirilmesi çalışmaları yapmışlardır.

Bu çalışmada da ülkemizin değişik bölgelerinden izole edilen ve AB Referans Laboratuvarı Danish Institute for Food and Veterinary Research, Danimarka tarafından sıra analizi ile Sp olarak serotiplendirilen 10 adet IPNV izolatına üç immu-

nizasyon prosedürü ile Ab, Sp ve VR299 serotiplerine karşı üretilen antiserumlar ile nötralizasyon test uygulanmıştır.

Üç immunizasyon prosedürü ile Sp serotipine karşı üretilen antiserumların kullanım titrelerinde (SN₅₀) saha izolatlarını nötralize ettiği, Ab ve VR299 serotiplerine karşı üretilen antiserumların ise kullanım titrelerinde çapraz reaksiyon vermediği görülmüştür.

Çalışmamızın sonucunda purifiye 1 ve purifiye 2 immunizasyon yöntemleri kullanılarak elde edilen antiserumların, IPNV'unun baskılayıcı etkisi nedeni ile diğer balık hastalıklarının özellikle VHS ve IHN enfeksiyonlarının tespiti için saha materyallerinin IPN serumu ile nötralize edilmesinde kullanıma elverişli bulunmuştur. Çapraz reaksiyonlar değerlendirildiğinde, bu çalışmada da konsantre virus (500 µg/tavşan) + FIA ile tavşanların im immunizasyonu, 4 hafta sonra çıplak virus (500 µg/tavşan) ile iv immunizasyonu ile elde edilen antiserumların hem diğer serotipler ile çapraz reaksiyonlarının düşük olması hem de diğer balık virusları ile çapraz reaksiyonlarının bulunmamasından dolayı kullanıma en elverişli antiserumlar olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Anonim** (2001) *Commission Decision 2001/183/EC of 22 February 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish disease and repealing Decision 92/533/EEC*. Erişim: <http://eurlex.europa.eu> Erişim tarihi: 07.07.2010.
2. **Anonim** (2006) *Council Directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products, thereof and on the prevention and control of certain disease in aquatic animals*. Erişim: <http://eurlex.europa.eu> Erişim tarihi: 07.07.2010.
3. **Anonim** (2006) *Infectious Pancreatic Necrosis, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal*. 176-186. 5th edition, Paris, France.
4. **Castric, J., Baudin-Laurench, F., Cowtwns, M.F., Auffret, M.** (1987) *Isolation of infectious pancreatic necrosis virus Ab serotype from a epizootic in farmed turbot (scophthalmus maximus) and scallups (pecten maximus)*. *Aquaculture*, 67: 117-126.
5. **Christie, K.E., Havarstein, L.S., Djupvic, S.** (1990) *Infectious Pancreatic Necrosis in Norway, partial serotyping by monoclonal antibodies*. *J. Fish Dis.*, 13: 323-327.

6. **Dixon, P.F., Hill, B.J.** (1983) *Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use.* J. Fish Dis., 6: 399-409.
7. **Evensen, Q., Lorenzen, E.** (1997) *Simultaneous demonstration of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and falavobacterium psychrophilum in paraffin-embedded specimens of rainbow trout oncorhynchus mykiss fry by use of paired immunohistochemistry.* Dis. Aquat. Org., 29: 227-232.
8. **Hanly, W.C., Arthwall, J.E., Bennet, B.T.** (1995) *Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry.* ILAR, J., 37: 93-118.
9. **Hattori, M., Kodama, H., Ishiguro, S., Honda, A., Mikami, T., Izawa, H.** (1984) *Invitro an invivo detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay.* Am. J. Vet. Res., 45 (9): 1876-1879.
10. **Hill, B.J.** (1982) *Infectious pancreatic necrosis and its virulence.* 91-114. In: Roberts, R.J. (Ed): Microbial Diseases of Fish. Academic Press, London, UK.
11. **Hill, B.J., Way, K.** (1988) *Proposed standardisation of the serological classification of aquatic birnavirus.* International Fish Health Conference, Vancouver, Canada. Abstract pp.154.
12. **Hill, B.J., Way, K.** (1995) *Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses.* Ann. Rev. Fish Dis., 5: 55-77.
13. **Hill, B.J., Williams, R.F., Finlay, J.** (1981) *Preparation of antisera against fish virus disease agents.* Dev. Biol. Standard., 49: 309-218.
14. **Lecomte, M., Arella, I., Berthaume, I.** (1992) *Comparison of polyclonal and monoclonal antibodies for serotyping infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains isolated in Eastern Canada.* J. Fish. Dis., 15: 431-436.
15. **Lee, M.K., Blake, S.L., Singer, T., Nicholson, B.L.** (1996) *Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphisms.* Appl. Environ. Microbiol., 62 (7): 2513-2520.
16. **Leenaars, M., Hendriksen, F.M.C.** (2005) *Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies evaluation and recommendations.* ILAR J., 46 (3): 269-279.
17. **Mc Allister, P.E., Schill, B. W.** (1977). *Immunoblot assay: A rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses.* J. Wildl. Dis., 22 (4): 468-474.
18. **Mortensen, S.H., Hjeltne, B., Rodseth, O., Krogsura, J., Christie, K.E.** (1990) *Infectious pancreatic necrosis virus serotype NI, isolated from Norwegian halibut (Hippoglossus hippoglossus), turbot (scophthalmus maximus) and scallapsus (pecten maximus).* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 10: 42-43.
19. **Nakajima, K., Maeno, Y., Arimoto, M., Inouye, K., Sorimachi, M.** (1993) *Viral deformity of yellowtail fingerlings.* Fish Pathol., 28: 125-129.
20. **Nicholson, B.L.** (1993) *Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses.* Annu. Rev. Fish Dis., 3: 241-257.
21. **Özyer Özkan, B., Çağrgan, H.** (2008) *İnfeksiyöz pankreatik nekrozis hastalığının teşhisi için enzimelinked immunosorbent assay geliştirilmesi.* Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg., 30 (44): 15-22.
22. **Rodriquez, S., Vilas, P., Peres, S.** (1993) *A viral diagnostic survey of Spanish rainbow trout farms: I. Sensitivity of four cell lines to wild IPNV isolates.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13 (4): 119-122.
23. **Rodriquez, S., Vilas, M.P., Alonso, M., Perez, S.** (1995) *Study of viral dual infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by seroneutralization, western blot and polymerase chain reaction assay.* Microbiologia. 11 (4): 461-470.
24. **Sanjuan, M.I., Yus, E., Fernandez, G., Perez, S., Solana, A.** (1992) *Production of antisera against the virus infectious pancreatic necrosis (IPNV).* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 12 (3): 107.
25. **Stewart-Tull, D.E.S.** (1995) *The theory and practical application of adjuvants.* 181-182. In: Asherson, G.L. (Ed): Reviews in Medical Virology. Vol.5, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.
26. **Wolf, K.** (1988) *Fish Viruses and Fish Viral Disease.* Cornell University Press, Ithaca, NY.
27. **Wolski, S.C., Roberson, B.S., Hetrick, F.M.** (1986) *Monoclonal antibodies to the Sp strain of infectious pancreatic necrosis virus.* Vet. Immunol. Immunopathol., 12: 373-381.

Yazışma Adresi:

Dr. Gülnur KALAYCI

Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü

Viroloji Bölümü

35010 Bornova-İZMİR

E-mail: gulnurunver@yahoo.com

AKUAKÜLTÜR SEKTÖRÜNDE ARTAN ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİ VE İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ

THE INCREASE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN AQUACULTURE AND ITS EFFECTS ON HUMAN HEALTH

Meriç Lütfi AVSEVER¹

Necla TÜRK²

Serra TUNALIGİL¹

Geliş Tarihi (Received): 20.08.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 04.11.2010

ÖZET

Akuakültür sektöründe balıkları hastalıklardan korumak ya da tedavi etmek amacıyla yoğun miktarlarda antibiyotik kullanılmaktadır. Antibiyotik uygulamaları balık patojenleriyle birlikte zoonotik balık bakterilerinin de antibiyotiklere direnç kazanmasına sebep olmaktadır. Antibiyotiklere direnç geliştiren zoonotik balık bakterileri insanlar için daha tehlikeli olmakta ve tedavisi güç enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu çalışmada, Ulusal Balık Hastalıkları Referans Laboratuvarı olan Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (BVKAE) Bakteriye Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında izole edilen, zoonotik potansiyeli olan, 30 kültür balığı izolatı ve 30 doğa balığı izolatı üzerinde antibiyotik duyarlılık testi sonuçları karşılaştırıldı. Kültür balığı izolatlarının doğa balığı izolatlarından daha dirençli (% 3.3-60) olduğu saptandı. Bu durum akuakültür sektöründeki aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak öngörülmekte olup, insan sağlığı yönü ile dikkat çekicidir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık testi, doğa balığı, identifikasyon, izolasyon, kültür balığı, zoonotik balık bakterileri.

SUMMARY

High amounts of antibiotics are used in the aquaculture sector for protection against fish diseases or treatment of fish. These antibiotic applications cause emergence of resistance in fish pathogens as well as in zoonotic bacteria. Fish-borne zoonotic bacteria resistant to antibiotics are more hazardous to human health and cause infections that are difficult to cure. In this work, 30 zoonotic fish isolates from cultured fish and 30 zoonotic bacteria from wild fish that have been isolated in Bacterial Fish Diseases Laboratory, Bornova Veterinary Control and Research Institute (BVCRİ), National Reference Laboratory for Fish Diseases, were subjected to antibiotic susceptibility testing and the results were compared. As a result of this work, the isolates from cultured fish were determined to be much more resistant (3.3-60 %) to antibiotics than the isolates from wild fish. This situation is regarded as a result of incorrect or over-use of antibiotics in the aquaculture sector and its impact on human health is worthy of our attention.

Key words: Antibiotic susceptibility testing, aquaculture fish, fish-borne bacterial zoonosis, identification, isolation, wild fish.

GİRİŞ

Türkiye’de yıllık balık üretimi ortalama 700.000 tondur. Bunun 150.000 tonu çiftliklerden yetiştiricilik yoluyla sağlanmakta olup, bu miktarın önemli bir kısmı ihraç edilmektedir (4). Kültür balıkçılığında verimi ve karlılığı etkileyen önemli faktörlerin başında hastalıklarla ilgili sorunlar yer almaktadır. Balıklarda en yaygın görülen hastalıklar ise bakteriyel kökenli hastalıklardır. Gerek balıkları bakteriyel hastalıklardan korumak, gerekse hasta olanları tedavi etmek amacıyla yoğun miktarda antibiyotik kullanılmaktadır. Yanlış antibi-

yotik uygulamaları, balık patojenleriyle birlikte zoonotik balık bakterilerinin de antibiyotiklere direnç kazanmasına sebep olmaktadır (18).

Önemli zoonotik balık bakterileri içerisinde *Mycobacterium marinum*, *Nocardia spp.*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garviae*, *Micrococcus lylae*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Erysipelotrix insidiosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Raoultella ornithinolytica*, *Pseudomonas spp.*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Yersinia ruckerii*

¹ Veteriner Hekim, Dr. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 35010, İZMİR.

² Uzman Veteriner Hekim. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 35010, İZMİR.

ve *Stenotrophomonas maltophilia* bulunmaktadır (7, 15, 16, 18, 21, 23, 24).

Antibiyotik kullanımı konusundaki yanlış uygulamalar, balık hastalıklarının tedavisini zorlaştırırken, insan sağlığını ise doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Doğrudan etkide; balık bakterileriyle birlikte zoonotik balık bakterilerinin de direnç kazanması söz konusudur. Bu dirençli suşlar insanları enfekte ettiğinde ise tedavisi güç infeksiyonlar oluşabilir (18). Çiğ olarak tüketilen ve yenmeye hazır su ürünleri üzerinde yapılan bir araştırmada (11), bunlardan elde edilen 1564 izolatın % 42'sinin kullanılan 10 çeşit antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dirençli suşlar arasında zoonotik balık bakterilerinin olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca akvaryum balıklarında *M. marinum* gibi zoonotik etkenler de antibiyotiklere direnç gelişimi göstermekte ve akvaryum temizliği sırasında dirençli suşlar insanları enfekte edebilmektedir (6). Antibiyotik dirençliliğinin dolaylı etkisinde ise, balık bakterilerindeki direnç plazmitlerinin insan patojenlerine aktarılması ve direnç kazanan insan patojenlerinin insanlarda dirençli infeksiyonlar oluşturması söz konusudur. Çoklu antibiyotik direnç genlerinin, balık patojenlerinden insan patojenlerine aktarıldığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (18, 20, 24).

Bu çalışmanın amacı, BVKAE Bakteriyele Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında izole edilen, zoonotik potansiyeli olan, kültür ve doğa balıklarına ait izolatların antibiyogram sonuçlarını karşılaştırmak, kültür balıkçılığı sektöründe artan antibiyotik dirençliliğine ve bunun insan sağlığına yansımalarına dikkat çekmektir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışma kapsamında BVKAE Bakteriyele Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında izole edilen zoonotik balık bakterilerinden; 30 adet doğa balığı kökenli, 30 adet kültür balığı kökenli olmak üzere toplam 60 adet izolat kullanılmıştır.

Doğa balıklarından elde edilen izolatlar *V. vulnificus* (7 adet), *A. hydrophila* (5 adet), *V. alginolyticus* (5 adet), *Y. ruckerii* (3 adet), *Pseudomonas fluorescens* (1 adet), *M. lylae* (1 adet), *R. ornithinolytica* (3 adet), *L. garvieae* (2 adet),

Pseudomonas lufida (1 adet), *P. shigelloides* (1 adet), *S. maltophilia* (1 adet); kültür balıklarından elde edilenler ise *V. vulnificus* (8 adet), *A. hydrophila* (5 adet), *V. alginolyticus* (5 adet), *Y. ruckerii* (3 adet), *P. fluorescens* (1 adet), *V. parahaemolyticus* (2 adet), *M. lylae* (2 adet), *R. ornithinolytica* (1 adet), *L. garvieae* (2 adet), *P. shigelloides* (1 adet) şeklindedir.

İzolasyonların yapıldığı başlıca balık türleri çipura, levrek, alabalık, sazan, sarıağız, orkinos, kefal ve akvaryum balıklarıdır.

Metot

Bakteri izolasyonu

Balık numunelerinin karaciğer, dalak ve böbreklerinden TSA (Tripticase soy agar), BHI agar (Brain Heart Infusion agar), TCBS agar (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar) ve Kanlı agar ortamlarına ekimler yapıp, 22° C'de 24-72 saat inkübe edilmiştir. Deniz balıkları için besi yeri ortamına % 1.5 oranında NaCl ilave edilmiştir (7).

İdentifikasyon

İzole edilen etkenler klasik bakteriyolojik yöntemlerle (7) identifiye edilmiştir. Ayrıca etkenlerin identifikasyonunda ve teyit edilmesinde Mini API ve Vitek-2 Compact identifikasyon cihazlarından yararlanılmıştır. Klasik identifikasyonda Gram boyama, hareket muayenesi, oksidaz ve katalaz testlerini takiben aşağıdaki biyokimyasal testler yapılmıştır: O/129 Vibriostat duyarlılık testi, glikoz, gaz oluşturma, laktoz, mannitol, üre hidroliz, oksidasyon fermantasyon, Arjinin hidrolaz (ADH), Lizin dekarboksilaz (LDC), Ornitin dekarboksilaz (ODC), Orto-Nitrofenil-Beta-Galaktosidaz (ONPG), nitrat redüksiyon, Voges-Proskavır (VP), Metil Red (MR), indol, eskulin hidroliz, jelatin hidrolaz, polimiksin B ve novobiyosin duyarlılık ve diğer şeker testleri (arabinoz, inasitol, salisin, sükröz, sakkaroz).

Antibiyotik duyarlılık testi

McFarland 0.5 standardına göre hazırlanmış bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton besi yerine (10) steril şartlarda yayıldıktan sonra besi yeri yüzeyi kuruyunca test stripleri yerleştirilerek inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra zon çapları

“mm” olarak ölçülmüş, sonuçlar referans değerlerle karşılaştırılmıştır (3, 8, 13, 17).

Çalışmada Florfenikol (FFC) 30 µg, Enrofloksasin (ENR) 5 µg, Flumekuın (UB) 30 µg, Oksolinik asit (OA) 2 µg, Oksitetrasiklin (OT) 30 µg, Sülfametaksazol- Trimetoprim (SXT) 25 µg, Eritromisin (E) 15 µg ve Amoksisilin (AM) 30 µg ticari antibiyotik diskleri (Oxoid marka) kullanılmıştır.

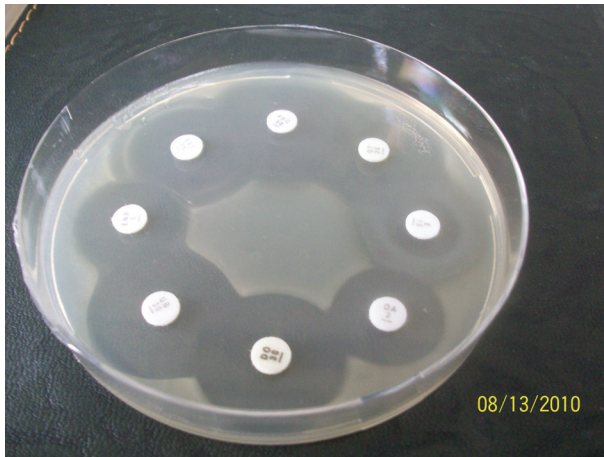
BULGULAR

Doğa ve kültür balığı izolatlarının yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 1’de belirtilmiştir. Sonuçlar 30 doğa balığı ve 30 kültür balığı izolatına aittir.

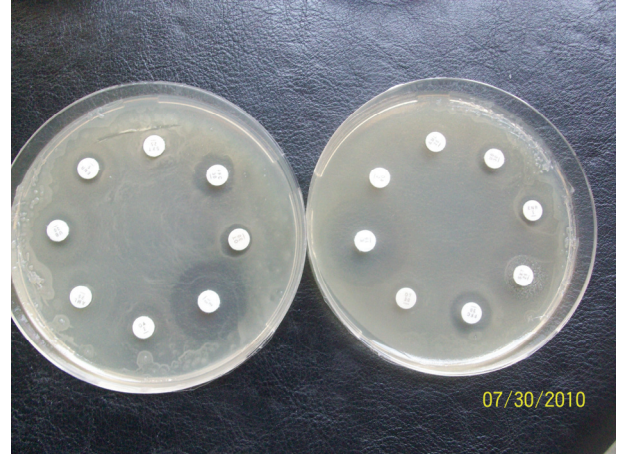
Tablo 1. Doğa ve kültür balığı izolatlarına ait antibiyotik duyarlılık oranları.

Kullanılan Antibiyotik Diskleri	Doğa Balığı İzolatlarındaki Duyarlılık Oranı %	Kültür Balığı İzolatlarındaki Duyarlılık Oranı %
FFC	96.6	93.3
ENR	93.3	60
UB	86.6	36.6
OA	80	33.3
OT	73.3	16.6
SXT	73.3	13.3
E	70	13.3
AM	66.6	13.3

Doğa ve kültür balığı izolatları arasındaki antibiyotik dirençlilik farkı Şekil 1 ve 2’de örneklendirilmiştir.



Şekil 1. Doğa balığı izolatlarından yapılan antibiyogram testlerine örnek (yüksek derecede antibiyotik duyarlılığı).



Şekil 2. Kültür balığı izolatlarından yapılan antibiyogram testlerine örnek (yüksek derecede antibiyotik dirençliliği).

Kültür balıklarından elde edilen iki izolat, kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli bulunurken doğa balığı izolatlarında bu durum gözlenmemiştir. Antibiyotiklere dirençlilik yönünden incelendiğinde; dirençliliğin *P. fluorescens* izolatlarında en fazla olduğu, bunu *S. maltophilia*, *P. lufida*, *P. shigelloides*, *V. vulnificus*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* izolatlarının izlediği, dirençliliğin *Y. ruckerii*, *M. lylae*, *R. ornithinolytica* ve *L. garviae*’da ise nispeten daha az olduğu bulunmuştur.

Balık türü düzeyinde antibiyotiklere dirençlilik yaygınlığına bakıldığında ise dirençli izolatların en fazla çipura, levrek, akvaryum balığı ve alabalıktan sağlandığı, bunu sazan, sarıağız, orkinos ve kefal’in izlediği saptanmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Üzerinde çalışılan kültür ve doğa balığı izolatlarında; doğa balığı izolatlarındaki duyarlılığın % 66.6’nın altına düşmemesine rağmen, kültür balığı izolatlarında bu oranın % 13.3 civarına düşmesi; diğer taraftan kullanılan antibiyotiklerin tamamına dirençli olduğu saptanan iki izolatın da kültür balıklarına ait olması dikkat çekicidir.

Akuakültür sektöründeki antibiyotik dirençliliği daha önceki araştırmalarda (9, 12, 14, 19, 22) bildirilmiştir. Aoki ve Egusa (5)’nin Japonya’da yaptıkları araştırmada, kültür ve doğa balıklarından sağlanan izolatlar antibiyotik duyarlılığı yönünden karşılaştırılmış, kültür balığı izolatlarının antibiyotiklere daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu

durum akuakültür sektöründeki antibiyotik baskısı ile ilişkilendirilmiştir. Twiddy (22), balıklardan izole ettikleri insan patojenleri ile ilgili yaptığı antibiyotik duyarlılık çalışmasında, özellikle rutin olarak yemlerine antibiyotik katılan kültür balıklarından sağlanan izolatların (*Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas* ve *Plesiomonas* türleri) antibiyotiklere yüksek dirençli olduğunu bulmuştur. Bunu koruma amaçlı kullanılan antibiyotiklerle ilişkilendirmiştir. Çalışmamız, akuakültür sektöründe aşırı antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen antibiyotik dirençliliği yönü ile bu çalışmalarla (5, 9, 12, 14, 19, 22) uyumludur.

Akinbowale ve ark. (1), Avustralya'da kültür balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada, izole ettikleri 100 Gram negatif (çoğunluğu *Vibrio* ve *Aeromonas* türlerine ait) ve 4 Gram pozitif bakteri üzerinde antibiyotik duyarlılık testi yapmışlardır. Test sonrasında amoksisilin ve eritromisin dirençliliğinin çok yaygın (% 54.8, % 47.1); oksitetrasiklin dirençliliğinin yaygın (% 19.2); florfenikol, oksolinik asit, sülfametaksazol+ trimetoprim dirençliliğinin ise daha az yaygın (% 8.7, % 8.7, % 3.9) olduğunu tespit etmişlerdir. Antibiyotiklerin duyarlılık bulguları yönü ile çalışmamız bu araştırma ile benzerlik göstermekte olup, oksolinik asit ve sülfametaksazol + trimetoprim ile ilgili verilen yüksek duyarlılık sonucu ile farklılık göstermektedir. Bu iki antibiyotik çalışmamızda yüksek dirençli bulunmuştur. Ancak bu bulgumuz Alcaide ve ark. (2)'nin Avrupa'da kültür balıkları üzerine yaptıkları çalışma ile uyumludur. Bu durum bakteri orijinlerinin kıtasal farklılıklarından ya da söz konusu etken maddelerin ülkemizde yaygın kullanımından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak, çoğunluğu Ege bölgesi ve çevresinden sağlanmış olan doğa ve kültür balığı izolatları üzerinde yapılan çalışmada, kültür balıklarından izole edilen bakterilerin doğa balıklarından izole edilen bakterilere oranla antibiyotiklere daha dirençli oldukları belirlenmiştir. Bunun muhtemel sebebi kültür balıkçılığı sektöründeki aşırı ya da yanlış antibiyotik uygulamalarıdır. Bu yanlış uygulamalar, balık patojenleriyle birlikte zoonotik balık bakterilerinin de direnç kazanmasına sebep olmakta ve bunun sonucu insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle bakteriyel

hastalıklara karşı tedavi uygulanırken antibiyogram test sonuçlarının dikkate alınması, bu şekilde belirlenen antibiyotiklerin ise uygun doz ve sürede tatbik edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D.** (2006) *Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia*. J. Appl. Microbiol., 100 (11): 1103-1113.
2. **Alcaide, E., Blasco, M-D., Esteve, C.** (2005) *Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms*. Appl. Environ. Microbiol., 71 (6): 3348-3350.
3. **Alderman, D.J., Smith, P.** (2001) *Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases*. Aquaculture, 196: 211- 243.
4. **Anonim.** Balık Üretimi. Erişim: <http://www.gidasanayii.com/modules.php?name=News&file=article&sid=15281> Erişim tarihi: 18.11.2010.
5. **Aoki, T., Egusa, S.** (1971) *Detection of resistance factors in fish pathogen Aeromonas liquefaciens*. J. Gen. Microbiol., 65: 343-349.
6. **Aubry, A., Jarlier, V., Escolano, S., Truffot-Pernot, C., Cambau, E.** (2000) *Antibiotic susceptibility pattern of Mycobacterium marinum*. Antimicrob. Agents and Chemother., 44 (11): 3133-3136.
7. **Austin, B., Austin, D.A.** (1987) *Miscellaneous pathogens*. p.303. In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds): Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Chapter 12, Ellis Harword Ltd., New York.
8. **Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shryock, T., Shuster, D., Thomas, V., Valle, M., Walters, J.** (2004) *A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals*. J. Antimicrob. Chemother., 54: 744-754.
9. **Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G., Banat, I. M.** (2003) *Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean*. Aquaculture, 219: 83-97.
10. **Dalsgaard, I.** (2001) *Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria*. Aquaculture, 196: 267- 275.

11. **Durán, G.M., Douglas, L.M.** (2005) *Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of antibiotic-resistant bacteria*. J. Food Prot., 68 (7): 2395-2401.
12. **Herwig, R.P., Gray, J.P., Weston, D.P.** (1997) *Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington*. Aquaculture, 149: 263-283.
13. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenerger, P.C., Winn, W.C.** (1992) *Antimicrobial susceptibility testing*. 609-668. In: Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenerger, P.C., Winn, W.C. (Eds): *Diagnostic Microbiology*. 4th ed. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa.
14. **McPhearson, R.M., DePaola, S.R., Zywno, M.L., Motes, J., Guarino, A.M.** (1991) *Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds*. Aquaculture, 99: 203-211.
15. **Morris, A.C., Schwabacher, H., Lynch, P.G., Cross, C.D., Dada, T.O.** (1965) *Two fatal cases of septicemia due to Erysipelothrix insidiosus*. J. Clin. Pathol., 18: 614.
16. **Morais, V.P., Daporta, M.T., Bao, A.F., Campello, M.G.** (2009) *Enteric fever-like syndrome caused by Raoultella ornithinolytica (Klebsiella ornithinolytica)*. Clin. Microbiol., 47 (3): 868-869.
17. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)** (2000) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-Fifth Edition: Approved standard M7-A5*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
18. **OIE (Office International des Epizooties)** (2006) *Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance*. Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation. Seoul, Republic of Korea, 13-16 June, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
19. **Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L.** (2000) *Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms*. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4908-4915.
20. **Sorum, H.** (2006) *Antimicrobial drug resistance in fish pathogens*. 213-238. In: Aarestrup, F.M. (Ed): *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. ASM Pres, Washington DC, USA.
21. **Trevejo, R.T., Barr, M.C., Robinson, R.A.** (2005) *Important emerging bacterial zoonotic infections affecting the immunocompromised*. Vet. Res., 36: 493-506.
22. **Twiddy, D.R.** (1995) *Antibiotic-resistant human pathogens in integrated fish farms*. ASEAN Food J., 10: 22-29.
23. **Wang, Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh, I.C., Wen, M.S., Lin, F.C., Wu, D.** (2007) *Lactococcus garvieae Infections in Humans: possible association with aquaculture outbreaks*. Int. J. Clin. Pract., 61 (1): 68-73.
24. **Welch, T.J., Fricke, W.F., McDermott, P.F., White, D.G., Rosso, M-L. et al.** (2007) *Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk*. PLoS ONE, 2 (3): e309. doi:10.1371/journal.pone.0000309.

Yazışma Adresi:

Dr. Meriç Lütfi AVSEVER
Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,
Bakteriyel Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı,
35010 Bornova / İZMİR
E-mail: lutfiavsever@gmail.com

TÜRKİYE'DE YABANI KUŞLARDA AVIAN INFLUENZA VİRUSUNUN (AIV) VARLIĞI

THE PRESENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (AIV) IN WILD BIRDS IN TURKEY

Fethiye ÇÖVEN¹ Özgür KEŞAPLI DIDRICKSON² Emre TEPEDELEN³ Özge KEŞAPLI CAN²
Can BİLGİN² Belgin AŞIKLAR⁴ Hüseyin ATİK⁵

Geliş Tarihi (Received): 14.09.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 03.11.2010

ÖZET

Yüksek Patojen Avian Influenza (Highly Pathogenic Avian Influenza-HPAI) viruslarının sağlıklı yabani kuşlarda görülme sıklığının tespiti amacıyla yapılan bu çalışma; Kızılırmak Deltası (Samsun), Yumurtalık Lagünleri (Adana) ve Nallıhan Kuş Cenneti'ni (Ankara) kapsayan 3 alanda yürütüldü. Türkiye kıyılarındaki sulak alanlardan kıyı kuşlarının geçiş yaptığı, kışladığı ya da yüksek sayılarda görülebildikleri bir dönemde örnek alımı yapıldı. Çalışma kapsamında 22 türe ait 329 kıyı kuşundan alınan toplam 658 kloakal ve trakeal sıvab örneğinde, Avian Influenza A virusunun M proteinini kodlayan gen bölgesindeki özgün bir kısım, Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RRT-PCR) testi ile tarandı ve 96 örnek pozitif, 57 örnek şüpheli, 505 örnek negatif bulundu. Real-Time RT-PCR testinde pozitif ve şüpheli pozitif bulunan örneklerden virus izolasyonu, embriyolu Specific Pathogen Free (SPF) tavuk yumurtalarında yapıldı. Kızılırmak Deltasında bir yaban ördeğinden alınmış olan ve pozitif bulunan örneğin birinci yumurta pasajında virus izole edildi. Geri kalan toplam 152 örnekten yapılan 3 seri pasaj sonucunda ise virus izolasyonu yapılamadı. İzole edilen suş, standart antiserumlar kullanılarak Hemaglutinasyon – İnhibisyon (HI) ve Nörominidaz - İnhibisyon (NI) Testleri sonucunda H12N2 olarak identifiye edildi. Ekim 2006 – Ocak 2007 tarihleri arasında yapılan bu çalışma, Türkiye'de yabani kuşlardan örnek alınarak gerçekleştirilen ilk Avian Influenza virus (AIV) tarama çalışmasıdır.

Anahtar kelimeler: PCR, tarama, Türkiye, yabani kuşlar, Yüksek Patojen Avian Influenza.

SUMMARY

This study was conducted in three regions including, the Kızılırmak Delta of the city of Samsun, Yumurtalık Lagoon of the city of Adana and Nallıhan Bird Paradise of the city of Ankara to determine the prevalence of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) viruses in healthy wild birds. Samples were collected at a time when the shore birds trespassed or spent the winter or where they were seen in high numbers at the wetlands of the Turkish coasts. In this study, 658 cloacal and tracheal swab samples from 329 wild birds belonging to 22 genera were collected. Avian Influenza virus M protein encoding gene was detected from samples by a commercial Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RRT-PCR) and 96 samples were found to be positive, 57 samples were found to be suspicious, 505 samples were found to be negative. Real-Time RT-PCR test positive and suspicious samples were used for Avian Influenza virus isolation in embryonated Specific Pathogen Free (SPF) chicken eggs. The virus was isolated only in one sample from a wild duck from the Kızılırmak Delta, no isolation was done from the other RRT-PCR positive samples after the third passage. Using standard Avian Influenza virus (AIV) antisera, Hemagglutination - Inhibition and Neurominidase-Inhibition tests were carried out and the isolate was identified as H12N2. This study which took place between October 2006 - January 2007 is the first study conducted on samples taken from wild birds for Avian Influenza virus monitoring in Turkey.

Key words: Highly Pathogenic Avian Influenza, monitoring, PCR, Turkey, wild birds.

¹Uzm.Vet. Hekim, Dr. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Lab., İZMİR.

²Ornitolog, Kuş Araştırmaları Derneği, ANKARA.

³Genmar Teşhis Ürünleri Tic. Ltd. Şt., İZMİR.

⁴Uzm. Biyolog, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Lab., İZMİR.

⁵Uzm.Vet. Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kanatlı Hastalıkları Teşhis Lab., İZMİR.

GİRİŞ

Avian Influenza (AI), evcil ve yabani kanatlılar ile memeli hayvanların çoğunda solunum, sindirim ve sinir sistemi belirtileri gösteren, ölümlü sonuçlanan çok bulaşıcı viral bir hastalıktır (45).

Hastalık etkeni Orthomyxoviridae familyasının Influenza genusuna ait, tek sarmallı, RNA taşıyan Influenza A virusudur. Influenza viruslarının A, B ve C olmak üzere üç tipi vardır. Avian Influenza'ya virusun A tipi neden olur. Influenza A virusunun, Hemaglutinin (HA) ve Nörominidaz (NA) yüzey glikoproteinlerinin serolojik reaksiyonlarına göre 16 H ve 9 N alt tipi bulunmaktadır. Günümüzde Influenza A viruslarının H5 ve H7 protein taşıyan alt tipleri patojenik suşlar olarak kabul edilmektedir (34). Bu suşlar % 100'lere varan ölümlere sebep olabilir. Diğer suşlar ya çok az hastalık belirtisine sebep olur ya da hiç fark edilmezler (45). Avian Influenza virusları dünya çapında yaygın olarak dağılım göstermektedir (30, 43, 45, 47). Avian Influenza konusunda yapılan çalışmalar, Düşük Patojen Avian Influenza (Low Pathogenic Avian Influenza- LPAI) ve Yüksek Patojen Avian Influenza (Highly Pathogenic Avian Influenza-HPAI) salgınlığının ve insidensinin 1981'den beri olduğunu ortaya koymaktadır (4, 18, 19, 46).

Göçmen su kuşlarında yapılan serolojik survey çalışmaları, AI virusları tarafından oluşturulan infeksiyonun yabancu kuşlardaki varlığını ortaya koymuştur (20). *Anseriformes* (ördek, kaz, kuğu) ve *Charadriiformes* (kıyı kuşları, martılar, deniz kırlangıçları, uzun gagalı su kuşları) takımlarına dahil olan türler, HPAI ve LPAI viruslarının endemik taşıyıcı ve yayıcıları olarak kabul edilmekle birlikte, hastalığa özgü klinik bulguları nadiren sergilerler (44, 48). Ancak virus, yabancu kuşlardan kümes hayvanlarına geçtiğinde ciddi ölümlere neden olur. Hastalık kanatlıların yanısıra at, maymun, domuz, vizon, dağ gelinciği, rat, çeşitli deniz memelileri, kedigiller familyasının üyeleri ve ayrıca insanlara da bulaşabilir (13, 22, 26-28, 37, 38, 42, 49, 50, 54).

Avian Influenza Virus (AIV)'nun ilk kez 1961 yılında Güney Afrika'da görülen bir salgında deniz kırlangıçlarında (*Sterna hirunda*) yüksek mortalite ile seyreden bir olgudan izole edildiği

bildirilmiştir (1, 5). 1983-1984 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri'nin Pennsylvania eyaletinde yaşanan AI salgını sırasında yabancu kuşlarında yoğun olarak yürütülen surveylans çalışmaları, su kuşlarının çok sayıda Influenza virusu taşıdığını doğrulamıştır (25). Su kuşlarında AI infeksiyonunun prevalansına ilişkin olarak, sonraki yıllarda yapılan bildirimlerde, oranlar % 0.6 ve % 26 arasında değişmektedir (2). Japonya'da kargalarda H5N1 virus alt tipi ile infeksiyon ve infeksiyon kaynaklı ölümler bildirilmiştir (31). HPAI H5N1 ilk defa 1996 yılında Hong Kong'ta tanımlanmış ve 1996'dan 2005 yılına kadar tüm Güney Asya'da kanatlı ve evcil su kuşu popülasyonuna yayılmıştır (23, 40, 41). H5N1 alt tipi ile infeksiyon sonucu, İtalya'da ördek ve kazlarda az sayıda ölümler gözlemlendiğine dair bildirimler mevcuttur (9-11). 2002 yılında Hong Kong'ta su kuşlarında ölümlere rastlandığı, 2004 yılında, Çin'de ördeklerde, kazlarda ve tavuklarda yaygın ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (33, 46). Rezervuar veya taşıyıcı hayvanların bir bölgeden başka bir bölgeye ya da ülkeye ulaşmasıyla AI tip A virusları geniş bir coğrafyaya yayılmaktadır (1, 8, 17, 35). 2005 yılında virus yabancu ve göçmen su kuşları ile yayılarak, Çin ve Moğolistan'da su kuşlarında salgınlar yaratarak tekrar ortaya çıkmıştır. Daha sonra virus bazı Orta Asya ve Doğu Avrupa ülkelerinde ve Batı Avrupa, Orta Doğu ve Afrika ülkelerinde yabancu ve evcil kanatlılarda identifiye edilmiş ve hastalığın bulaşma ve yayılmasını engellemek için milyonlarca evcil kanatlı itlaf edilmiştir (12).

Avusturalya sınırları içerisindeki birbirinden uzak bölgelerde, farklı H ve N alt tipinde pek çok AI virusu, göçmen türler de dahil olmak üzere, çok çeşitli yabancu su kuşlarından izole edilmiştir (3). Dolayısıyla, herhangi bir zaman diliminde, yabancu kuşlarında bulunan virus havuzundan ve özellikle H5 ve H7 alt tipinde AI viruslarından, evcil kümes hayvanları için virulent bir virusun ortaya çıkması mümkündür.

Yabancu kuşlarda, özellikle su kuşlarında LPAI veya HPAI virus suşları genellikle morbidite ve mortalite oluşturmamaktadır (20, 38, 45). Bununla beraber, son zamanlarda Asya, Afrika ve Avrupa'da HPAI virus H5N1 suşu ile infeksiyonda çeşitli yabancu kuşlarda mortalite rapor edilmiştir (33, 46).

Bazı vakalarda, mortalite güvercinlerde (*Colombia livia*) olduğu gibi sporadik ve bireysel olarak gözlenirken, kuğu ve kaz gibi bazı türlerde toplu kuş ölümleri gelişebilmektedir (12, 21, 39, 51). Deneysel çalışmalar özellikle ördeklerde olduğu gibi yabani kuşlarda da hastalık oluşumu ve ölümlerin büyük çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur (7, 36). Ancak yabani kanatlı populasyonlarında HPAI H5N1 virusuna maruz kalma, morbidite ve mortalite oranları henüz yeterli miktarda survey çalışması gerçekleştirilmediği için belirsizliğini korumaktadır.

Göçmen su kuşlarının yaşam alanlarının izlenmesinde çeşitli yöntemlerin kullanılması ve bu yöntemlerin iyileştirilmesinin başlıca amacı, yüksek patojeniteli Avian Influenza için erken uyarı kapasitesi oluşturulabilmesidir (29) Bu şekilde hastalık, evcil kümes hayvanlarına ve insanlara bulaşmadan önce enfeksiyonun kendisinin veya yüksek enfeksiyon riskinin saptanması amaçlanmaktadır.

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından, 2005 yılının Kasım ayında, Avian Influenza'yı Erken Algılama ve Önleme konusunda Doğu Avrupa, Ortadoğu ve Afrika'nın 5 bölgesinde 5 adet Teknik İşbirliği Programı (TİP) hazırlanmıştır. Bu programlar, HPAI H5N1 virusunun bölgeye potansiyel girişine ve ilerleyen yayılımına karşı acil eylem hazırlıklarını güçlendirmeye destek olmak amacıyla, ülkeler bazında, özellikle yabani kuşların göç ve ticaret ilişkileri ve bu yabani kuşların evcil kanatlılar ile etkileşimi dikkate alınarak düzenlenmiştir. Bu TİP'ler çerçevesinde, HPAI H5N1 salgınlarının olduğu ya da yabani kuşların hareketleri ile oluşabileceği düşünülen ülkelerde HPAI H5N1 virusunun yabani kuş popülasyonunda mevcudiyetini değerlendirmek için 2006 yılının başlarında bir surveylans çalışması başlatılmıştır. Bu programlar kapsamında FAO, Ulusal Veteriner Servisleri, Ulusal Yaban Hayatı Kuruluşları ve Uluslararası İşbirliği Merkezleri ile (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement [CIRAD]; Wetlands International) işbirliği yaparak saha surveylans çalışmaları ile eğitim ve kapasite arttırımı yoluyla laboratuvar teşhis kapasitelerinin geliştirilmesini hedeflemiştir. Aynı zamanda ulusal surveylans programları için kapasite geliştirme

yoluyla teknik saha prosedürlerinin standardizasyonu için destek amaçlanmıştır. Saha surveylans kampanyalarının uygulanması, CIRAD ve Wetlands International tarafından, Ulusal Yaban Hayatı organizasyonları ve Veteriner Servislerinin işbirliği ile koordine edilmiştir. FAO'nun Teknik İşbirliği Programı çerçevesinde, surveylans programları 17 ülkede yürütülmüştür.

Ana göç yolları üzerinde yer alan Türkiye, göçmen su kuşlarının konakladığı çok sayıda sulak alana ev sahipliği yapmaktadır. Bu durum son yıllarda edinilen deneyimler sonucunda yabani kuşlarının Türkiye'de kanatlı hayvanlara Avian Influenza virusunun bulaşmasında kilit bir rol üstlendiğini göstermektedir. Bu nedenle, Türkiye'de Avian Influenza'nın izlenmesi ve surveylansı, gerek ulusal gerekse de uluslararası düzeyde büyük önem arz etmektedir. Avrupa ve Ortadoğu'da yabani kuşu yaşam alanları bakımından en zengin ülkeler arasında yer alan ve yaklaşık 135 sulak alana ev sahipliği yapan Türkiye, bu proje kapsamında, önemli örnekleme alanlarından birisi olarak seçilmiştir. Çalışmada, değişik üreme alanlarından gelen su kuşlarının toplandığı ve karıştığı, AI virusunun bulaşma fırsatı bulacağı, değişik konakçı popülasyonları arasında ve geniş coğrafik dağılımlara yayılabileceği doğal alanlardan örnekleme yapılması hedeflenmiştir.

Bu çalışma da FAO tarafından organize edilen surveylans çalışmasının Türkiye'de yürütülen ayağını oluşturmuştur.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kloakal ve Trakeal Sıvap Örnekleri: Çalışma kapsamında 22 kuş türüne ait 329 kıyı kuşundan toplam 658 örnek alınmıştır. Aynı kuştan hem kloakal hem de trakeal sıvap örneği alımı yapılmıştır. Örnekler 3 farklı sulak alandan alınmıştır:

1. Adana ili sınırları içerisinde, Ceyhan Nehrinin ağzı ile Yumurtalık Körfezi arasında kalan ve Çukurova Deltası'nda yer alan, çok büyük bir sulak alan sistemi olan Yumurtalık Lagünlerinden 296 örnek,
2. Samsun ili sınırları içerisinde en büyük sulak alan olan Kızılırmak Deltasından 346 örnek,

3. Sakarya Nehri ile Kirmir ve Aladağ Çaylarının beslediği Sarıyar Barajı'nda yer alan Nallıhan Kuş Cenneti'nden 16 örnek alınmıştır.

Örnek alımında Dacron sıvaplar kullanılmıştır. Örnekler ulusal ve uluslararası uzmanlardan oluşan ekipler tarafından Ulusal Halkalama Programı kapsamında alınmıştır. Örnekler alındıktan sonra % 10 glycerol ile zenginleştirilmiş, içerisinde penisilin (10.000 Unite/ml), streptomisin (10mg/ml), amfoterisin B (25µg/ml) ve gentamisin (250 µg/ml) bulunan, pH'sı 7.0-7.4 olan Isotonic Phosphate Buffer Saline (PBS) içeren Viral Taşıma Vasatlarına (VTV) konularak, soğuk zincirde, çalışmaların yapılacağı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü bünyesinde bulunan AI / ND Ulusal Referans Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Örnek alım işlemi Kasım ayında kıyı Lagünlerinden (Kızılırmak Deltası ve Yumurtalık Lagünleri), Ocak ayında Nallıhan Kuş Cenneti'nden yapılmıştır. Hedef tür olarak AI rezervuarı olan kuş familyaları arasındaki kuş topluluklarından seçilmiştir (Tablo 1).

Specific Pathogen Free (SPF) Embriyolu Tavuk Yumurtası ve Cıvciv: Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Biriminden sağlanan SPF embriyolu yumurta ve SPF cıvcivler virus izolasyonu ve patojenite test çalışmalarında kullanılmıştır.

Avian Influenza Spesifik Antiserum: AI H1-H16 arası virüslere karşı hazırlanmış tip spesifik antiserumlar, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSV), İtalya'dan sağlanmıştır.

Avian Influenza Hızlı Test Kiti: Ticari olarak üretilen ve Influenza Tip A virusunun 16 alt tipini kalitatif olarak tespit etmek üzere tasarlanmış, antijen yakalayan strip test kiti (Synbiotics, Amerika Birleşik Devletleri, Fransa) kullanılmıştır.

Real Time PCR Test Kitleri: Viral Nükleik Asit izolasyonu için; High Pure Viral RNA Kit (Roche Applied Science, Amerika Birleşik Devletleri), cDNA sentezi için; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Amerika Birleşik Devletleri), Real-Time PCR Test için; LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe (Roche Applied Science, Amerika Birleşik Devletleri), Influenza virus A Matriks proteinini tespit için LightMix (TIB MOLBIOL, Almanya) kullanılmıştır.

Metot

Tüm örnekler, Influenza Virus tip A M2 geni için spesifik olan kit kullanılarak RRT-PCR metodu ile test edildi. Sıvap ile alınmış örnek içeren tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra sıvaplar dikkatlice

Tablo 1. Örneklenen Kuş Türlerinin Bölgelere göre Dağılımı

Tür Adı	Bilimsel Adı	Yumurtalık Lagünleri	Kızılırmak Deltası	Nallıhan Kuş Cenneti	TOPLAM
Karakarınlı kumkuşu	<i>Calidris alpine</i>	61	79		140
Küçük Kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	47	2		49
Kızılback	<i>Tringa tetanus</i>	1	37		38
Akça Cılıbt	<i>Charadrius alexandrinus</i>	33			33
Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>		17	8	25
Altın Yağmurcun	<i>Pluvialis apricaria</i>		11		11
Sukılavuzu	<i>Rallus aquaticus</i>		5		5
Çamurcun	<i>Anas crecca</i>		4		4
Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>		4		4
Suçulluğu	<i>Gallinago gallinago</i>		4		4
Yeşilback	<i>Tringa nebularia</i>	2	1		3
Gümüş Yağmurcun	<i>Pluvialis squatarola</i>		2		2
Karakızılback	<i>Tringa erythropus</i>	2			2
Bataklık Düdükünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	1			1
Döğüşkenkuş	<i>Philomax pugnax</i>		1		1
Kaşıkçaga	<i>Anas clypaeta</i>		1		1
Kılıççaga	<i>Recurvirostra avosetta</i>	1			1
Kızkuşu	<i>Vanellus vanellus</i>		1		1
Küçük Sarıback	<i>Tringa flavipes</i>		1		1
Küçük Suçulluğu	<i>Lymnocyptes minimus</i>		1		1
Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>		1		1
Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>		1		1
	TOPLAM	148	173	8	329

tüp kenarında bastırılarak dışarıya alındı, kaba partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 3500 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı çalışmalarda kullanılmak üzere ayrıldı.

Nükleik Asit İzolasyonu: Kit prospektüsünde bildirildiği şekilde yapıldı.

cDNA Sentezi: Kit prospektüsünde bildirildiği şekilde uygulandı.

Real – Time PCR Testi: LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe ve LightMix kitleri kullanılarak Light Cycler 2.0 cihazı (Roche Applied Science, Amerika Birleşik Devletleri) ile yapıldı. Testler kit prospektüsünde bildirildiği şekilde yapıldı.

RRT-PCR testinde pozitif ve şüpheli bulunan örneklerde virus izolasyonu çalışmaları yapıldı ve hızlı test uygulandı. Veri analizlerinin değerlendirilmeleri, örneklerin test sonuçlarının testte kullanılan negatif kontrol ve 6 adet pozitif standart (10^1 – 10^6 arası dilüsyonlarda) kontrol eğrileri ile karşılaştırılarak yapıldı. Grafik eğrileri negatif kontrol ile aynı düzlem üzerinde olan örnekler, negatif olarak değerlendirildi. Amplifikasyon eğrisinin negatif kontrol eğrisinin biraz üzerinde olan ve amplifikasyon eğrisinin en düşük standart (10^1) eğrisinin altında olan örnekler şüpheli, amplifikasyon eğrisinin kullanılan standart eğrilerinin parametreleri içerisinde olan örnekler pozitif, amplifikasyon tespit edilmeyen örnekler negatif olarak kabul edildi. Yapılan test sonucunda elde edilen verilerin amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizlerinin her ikisi de dikkate alınarak sonuçların değerlendirmeleri yapıldı.

Avian Influenza Hızlı Test: Kit prospektüsünde bildirildiği şekilde yapıldı.

Virus İzolasyonu: Alınan kloakal ve trakeal sıvı örneklerinde virus izolasyonu, Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından bildirilen standart metot kullanılarak yapıldı (34). İzolasyon çalışmalarında 9-11 günlük embriyolu SPF yumurtanın korioallantoik boşluğuna test edilecek örneklerden 0.2 ml miktarında inokulasyon yapıldı. İnokule edilen yumurtalar, 37°C 'de 5 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon esnasında yumurtalar sabah ve akşam kontrol edilerek canlılık muayeneleri yapıldı. İlk 24 saat içerisindeki embriyo

ölümleri nonspesifik kabul edilerek değerlendirilmedi. Daha sonra şekillenen ölümlerde yumurtalar $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde canlı kalan tüm yumurtalar, 1 gece $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra korioallantoik sıvıları toplandı ve standart metotlar kullanılarak hemaglutinasyon aktivitesi varlığı açısından test edildi.

Hemaglutinasyon (HA), Hemaglutinasyon-Inhibisyon Testi (HI): HA ve HI testleri Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından bildirilen standart test metotları kullanılarak yapıldı (34). Hemaglutinasyon aktivitesi tespit edilmeyen örneklerin korioalantoik sıvılarının 2 kez daha seri pasajları yapıldı.

Nörominidaz - Inhibisyon (NI) Test: NI Testi, AI /ND Topluluk Referans Laboratuvarı (VLA-İngiltere) tarafından hazırlanmış olan standart çalışma prosedüründe belirtilen metot kullanılarak yapıldı (52).

Intravenous Patojenite İndeks (IVPI) Test: Test, OIE tarafından bildirilen standart metot kullanılarak yapıldı (34).

BULGULAR

Real Time RT-PCR Test Sonuçları

Nallıhan Kuş Cennetinden (Ankara) alınan 16 örnekten 1'i pozitif, 1'i şüpheli ve 14'ü negatif bulundu. Yumurtalık Lagünleri'nden (Adana) alınan 296 örnekten 24'ü pozitif, 18'i şüpheli ve 254'ü negatif bulundu. Kızılırmak Deltası'ndan (Samsun) alınan 346 örnekten 71'i pozitif, 38'i şüpheli ve 237'si negatif bulundu.

Avian Influenza Hızlı Test Sonuçları

RRT-PCR testinde pozitif ve şüpheli bulunan örneklerde yapılan hızlı testlerde; Yumurtalık Lagünleri'nde (Adana) yaşayan kuşlardan alınan 11 örnek ve Kızılırmak Deltası'nda (Samsun) yaşayan kuşlardan alınan 17 örnek pozitif bulundu.

Virus İzolasyonu Sonuçları

RRT-PCR testinde pozitif ve şüpheli bulunan örnekler, virus izolasyonu amacıyla embriyolu SPF tavuk yumurtasına inokule edildi. Virus izolasyon çalışmalarında; Kızılırmak Deltası'dan (Samsun) gelen, yeşilbaş ördekte alınmış olan, bir adet kloakal sıvı örneğinden birinci pasajda virus

Tablo 2. Örneklere ait Laboratuvar Çalışmaları Sonuçları

Örnekleme Alanları	Toplam Örnek Sayısı	RRT-PCR Testi		Virus İzolasyonu	Hızlı Test	HI / NI	Negatif Örnek Sayısı
		Pozitif	Şüpheli				
Yumurtalık Lagünleri (Adana)	296	24	18	0	11	0	254
Kızılırmak Deltası (Samsun)	346	71	38	1	17	H12N2	237
Nallıhan Kuş Cenneti (Ankara)	16	1	1	0	0	0	14
TOPLAM	658	96	57	1	28	1	505

izolasyonu yapıldı. Diğer örneklerin yapılan 3 seri pasajları sonucunda HA aktivitesi yönünden negatif oldukları tespit edildi. İzole edilen suş, öncelikle matriks proteininin tespitine dayalı hızlı test ile test edilerek Avian Influenza virusu olduğu tespit edildi, daha sonra Hemaglutinasyon - İnhibisyon ve Nörominidaz - İnhibisyon testleri ile karakterize edildi. Bu amaçla H1-H16 arası standart antiserumlar kullanılarak identifikasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarda izole edilen örneğin, H12 antiserumu ile inhibe olduğu tespit edildi. N tipinin belirlenmesi için yapılan Nörominidaz -İnhibisyon testinde ise suşun N2 tipi olduğu tespit edildi. Patogenite testlerinde; izolasyonu yapılan virus, 4-8 haftalık SPF piliçlere damar içi yolla verildi ve virusun piliçlerde herhangi bir ölüm ya da hastalık oluşturmadığı ve IVPI'nin 0.00 olduğu bulundu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE)'nin önemli hastalıklar listesinde yer alan, gerek hayvan sağlığı, gerekse insan sağlığı açısından tehlikeli olan Avian Influenza hastalığı Türkiye'de de bildirim zorunlu hastalıklar listesinde (24, 33). Avian Influenza hastalığı epidemiyolojisi nedeni ile dünya çapında sınır tanımadan etkili olmaktadır. Hastalık etkeni, özellikle göçmen kuşlar ile göç güzergâhlarında bulunan ülkelere taşınmakta ve zaman zaman salgınlara neden olmaktadır (25, 35).

Son yıllarda artarak devam eden salgınlar dünya coğrafyasında hemen her bölgede görülmüş, yüz milyonlarca kanatlı hayvan telef olmuş ve hatta insan ölümlerine neden olmuştur (33, 53). Korunma ve kontrol için küresel boyutta önemli çalışmalar yapılmasına rağmen HPAI H5N1 tipi virus maalesef hala sirküle olmakta ve bazı ülkeler hastalıktan yoğun bir şekilde etkilenmektedir. Bu nedenle Avian Influenza ile mücadele sadece ulusal değil, uluslararası işbirliği gerektiren bir konudur.

Özellikle son yıllarda dünya gündemini meşgul eden küresel ısınmanın; göç yolları, göç zamanları ve göç eden kuş türlerinin değişimine neden olması, kanatlı hayvan varlığının dağılımı ve yoğunluğundaki gelişmeler, açıkta besleme modelleri, canlı kanatlı hayvan pazarları ve güvenli olmayan ticaret bu hastalığın dünyadaki yayılışı ile ilgili başlıca nedenler arasındadır (45).

Türkiye'de 1989 ve 2004 yılları arasında Avian Influenza'nın varlığının saptanması açısından çeşitli çalışmalar yapılmıştır (16). Bu çalışmalarda solunum sistemi ile ilgili problemler olan sürülerde ve klinik olarak normal görünümlü kanatlılarda Avian Influenza virusunun varlığının araştırılması hedeflenmiştir. Örnekler, ticari kanatlı sürüleri, hayvanat bahçelerindeki kanatlılar, kafes kuşları, evcil ve yabani kanatlılardan alınmıştır. Yaklaşık 593 sürü ve 55 yabani kuştan örnek alımı yapılmıştır. 7.300 organ numunesi / klokal sıvı örnekleri virolojik olarak, 27 bin dolayında da serum örneği serolojik olarak test edilmiştir. Değişik zaman dilimlerinde ve değişik coğrafik bölgelerde yapılan bu çalışmalarda test edilen sürülerin hiç birinde Avian Influenza virusu ve bu virusa karşı antikorun varlığı saptanmamıştır (16).

Türkiye'de Ekim 2005'e kadar Avian Influenza vakası rapor edilmemiştir. İlk vaka 5 Ekim 2005'de Balıkesir İli Manyas İlçesi Kızıksa Beldesinde açıkta yetiştirilen küçük çaplı bir hindi sürüsünde görülmüş ve HPAI H5N1 virusunun izolasyonu yapılmıştır (32). Virusun, NA geninin dizin analizi çalışmalarında A/Great Black Headed Gull/Qinghai/1/05 olarak tiplendirilmiş olan virusla yakın benzerliği olduğu (% 99.6) tespit edilmiştir. Bu nedenle de Türkiye izolatının, 2005 yılında Orta Asya'da izole edilen suşlarla direkt ilişkisinin olduğu ortaya konmuştur. Bu virusun HA geni, A/Grebe/Novosbrisk/05 suşu ile en yakın bulun-

muştur (% 98.7) ve bu nedenle de Türkiye izolasyonunun, o dönemde Rusya, Moğolistan ve Çin'de salgınlara sebep olan izolatlar ile direkt ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (14).

İlk vakayı takiben Manyas İlçesinin yakınında bulunan ve en büyük sulak alanlardan biri olan Manyas Kuş Cenneti ve yine aynı bölgede bulunan Uluabat Kuş Cenneti'ndeki yabancı kuşlarda bir survey çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmada bu sulak alanlarda bulunan değişik kuş türlerinden örnekler alınmış ve alınan örneklerde virus izolasyon çalışmaları yapılmış, hiçbirinden Avian Influenza virusu izole edilememiştir (16).

Van Gölü Havzası'nda 2006 yılında başlatılan ve 3 yıl süreyle devam eden bir çalışmada, çeşitli kanatlı türlerinden alınan dışkı materyalleri, AI tip A M2 geni yönünden RRT-PCR ile incelenmiş ve örneklerin % 2.7'si pozitif bulunmuştur. Pozitiflik saptanan türlerin ağırlıklı olarak *Anseriformes* ve *Charadriiformes* takımına ait su kuşları olduğu bildirilmiştir (6).

Asya kökenli HPAI H5N1'in yakın zamanda yayılması ve Türkiye'de sporadik olarak ortaya çıkması, gerek evcil kanatlılarda gerekse de yabancı kuşlarında surveylans ve erken teşhis sistemlerinin güçlendirilmesine olan gereksinime açıkça işaret etmiştir.

Türkiye; Avrupa, Ortadoğu, Hazar Denizi ve Afrika arasında uzanan dört önemli göç yolu üzerinde yer almaktadır. Bir doğa koruma alanı ve su kuşları için dünyaca tanınmış bir konaklama alanı olan Manyas Gölü, bu dört yoldan biri üzerinde yer alır ve Türkiye'deki ilk Avian Influenza mihrakı da anılan gölün yakınında açıkta yetiştirilen hindi-lerde ortaya çıkmıştır. Bu durum, yabancı kuşlarında Avian Influenza'nın evcil kümes hayvanları için teşkil ettiği riskin boyutunu ve hastalığın kontrolünün ve eradikasyonunun güçlüğüne açıkça ortaya koymaktadır (29).

Bu çalışmada, Türkiye'de yabancı kuşlarının daha iyi izlenmesini sağlamak ve böylece erken uyarı ve risk değerlendirme fonksiyonlarını güçlendirmek amacıyla yabancı hayatında ulusal bir survey çalışması planlanmış ve çalışmalar 3 büyük sulak alanda yürütülmüştür. Çalışmalar için, değişik üreme alanlarından gelen su kuşlarının toplandığı ve karıştığı, Avian Influenza virusunun bulaşma fırsatı bulacağı ve değişik konakçı popülasyonları

arasında ve geniş coğrafik dağılımlara yayılabileceği doğal alanlar hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında, Kızılırmak Deltası, Çukurova ve Ankara çevresinde yabancı hayatı ile ilgili sivil toplum kuruluşları ile işbirliği içerisinde aktif olarak yabancı hayatı surveyi yapılmıştır.

Kızılırmak Deltasının örnekleme alanı olarak seçilmesinin nedenleri; Karadeniz kıyılarında yer alan Samsun iline bağlı olan Bafra'da bulunan Kızılırmak Nehrinin deltası ve Çarşamba ilçesinde bulunan Yeşilirmak Nehrinin deltasının oluşturduğu iki büyük sulak alanın bulunmasıdır. Her yıl ilkbahar ve sonbahar döneminde çok sayıda göçmen su kuşu bu alanlardan geçer. Kızılırmak Deltası, el değmemiş flora ve faunaya sahip 70.000 hektarlık doğal bir alandır. Bu alanda 310 kuş türü bulunmakta, yaklaşık 100.000 göçmen ya da göçmen olmayan kuş bu alanda kış mevsimini geçirmektedir. Bu sulak alanların ekosistemi biyoçeşitlilik açısından oldukça zengindir. Yeşilirmak Deltası da benzer zengin doğal kaynaklara sahiptir. Evcil kümes hayvanları (özellikle tavuk, hindi, kaz ve ördek) bu sulak alanların yakınında bulunmaktadır. Bu alanlarda, mevsimsel su taşkınlarının yaşandığı dönemlerde, yabancı ve evcil kanatlılar arasında özellikle yabancı kuş sayısının en yüksek olduğu dönemde daha yakın bir ilişki bulunmaktadır.

Ayrıca, Samsun ili Avian Influenza hastalık salgınlarının en fazla rapor edildiği ildir. 2005-2006 salgınlarının devam ettiği dönemde ortaya çıkan vakaların yaklaşık % 25'i Samsun ilinde görülmüştür. Samsun'daki bu vakalardan 46'sı köy tavuklarından (Türkiye çapındaki 200 vakanın % 23'ü) ve 13'ü yabancı kuşlardan (Türkiye çapındaki 30 vakanın % 43'ü) saptanmıştır. Bu vakaların 58'inden HPAI H5N1, 1 vakadan da düşük patojen H7N1 virusu izole edilmiştir. Samsun ilinde köy tavuklarında yapılan bir serosurvey çalışmasında H5, H7 ve H9 antikorları tespit edilmiştir. Çalışma yapılan bölgede kan alınan hayvanlarda klinik tablo görülmemesine rağmen H5, H7 ve H9 antijenlerine karşı antikor tespit edilmesi ve yapılan virolojik çalışmada da virusun tespit edilememesi hayvanların bu viruslarla bir şekilde karşılaştıklarını göstermektedir (15, 16).

Survey alanlarından ikincisi olarak Doğu Akdeniz kıyısında, Adana ili sınırları içerisinde,

Ceyhan Nehri'nin ağız ile Yumurtalık Körfezi arasında kalan ve Çukurova Deltası'nda yer alan çok büyük bir sulak alan sistemi olan Yumurtalık Lagünleri, üçüncü alan olarak da Sakarya Nehri ile Kirmir ve Aladağ Çayları'nın beslediği Sarıyar Barajı'nda yer alan Nallıhan Kuş Cenneti seçilmiştir. Nallıhan Kuş Cenneti, hem geçmiş yıllarda yüksek sayıda angıt gözlendiği için hem de 2005 yılında Avian Influenza virusu taşıyan bir yaban ördeğinin tespit edildiği yere çok yakın olduğu için çalışma alanı olarak belirlenmiştir. Çalışmalarda hedef tür olarak Avian Influenza rezervuarı olan kuş familyaları arasındaki kuş toplulukları seçilmiştir. Örnekler ulusal ve uluslararası uzmanlardan oluşan ekipler tarafından toplanmıştır.

Bu çalışma, Türkiye'de kıyı kuşlarının ve diğer su kuşlarının ortak ve sistematik bir çabayla, Avian Influenza'nın izlenmesi amacıyla yakalandığı ve örneklendiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bu tip öncü çalışmalar belli bir deneyim ve kurumlar arası işbirliği gerektirdiğinden bu proje pilot nitelikte olmuştur.

Bu çalışmada 22 yabani kuş türündeki 329 kuştan alınan 658 kloakal ve trakeal sıvap örneklerinden yapılan RRT-PCR testlerinde; % 14.5'i pozitif, % 8.6'sı şüpheli olarak bulunmuş ve hiçbirinden HPAI virusu izole edilememiştir. Sadece Yeşilirmak Deltası'nda, yeşilbaş ördekten alınan bir izolat, LPAI H12N2 olarak tiplendirilmiştir.

Su kuşları, HPAI H5N1 virusunun sınır ötesine taşınma ve yayılmasında çok önemli rol oynamaktadır. Su kuşlarında H5N1 için yapılan kapsamlı araştırmalara rağmen, bu tarihe kadar sağlıklı kuşların çok azında virus tespit edilmiştir. Türkiye'de bugüne kadar su kuşu popülasyonunda HPAI H5N1 ve Influenzaya bağlı ölümlerin görüldüğüne dair bir veri bulunmamaktadır. Bununla beraber yaban kuşlarında yapılan pasif surveylans çalışmalarında HPAI H5N1 izolasyonları yapılmıştır. İnfekte ölü kuşları yiyen yırtıcı kuşlar ve fırsatçı yırtıcı kuşlarda da ölümler görüldüğü ve genellikle Avian Influenza mihraklarının görüldüğü şehirlerde yaşayan baykuşlarda ölümlerin olduğu bildirilmiştir. Göçmen kuşların HPAI H5N1 viruslarının muhtemel taşıyıcıları olduğu bilinmesine rağmen ülkemizde 2005 sonbaharında ve 2006 yılı boyunca canlı su kuşu ve kıyı kuşlarında yaygın survey çalışmaları yürütülmüş ve

HPAI virusu tespit edilmemiştir (15). Bununla beraber 2005-2007 yılları arasında yaşanan salgınlarda laboratuvarlara gelen değişik türlerdeki yabani kuşlardan virus izolasyonları yapılmış ve farklı türden 31 kuştan HPAI H5N1 virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir (15). Yapılan çalışmalarda şu ana kadar H5N1, yaban kuşlarında sadece pasif surveylans çalışmalarında tespit edilmiş, aktif surveylans çalışmalarında ise H5N1 tipi HPAI viruslarının nadiren tespit edildiği ortaya konulmuştur. Bu bulgular ışığında Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitülerine gelen tüm yabani kuşlar ve solunum sistemi problemi olan kanatlılar, Avian Influenza yönünden kontrol edilmektedir. Aktif surveylans çalışmaları riskli bölgelerde ve özellikle riskli dönemlerde devam etmektedir.

Avian Influenza dünyada halen risk olmaya devam etmekte olup kolayca taşınabilen bir hastalıktır. Tüm dünyayı etkisi altına alacak bir salgına yol açabileceğinden maddi ve manevi anlamda tehlikesi büyüktür. Göçmen kuşların Avian Influenza virusunun doğal taşıyıcısı olmalarından dolayı hastalığın yayılımını önlemek zordur. Türkiye'nin göçmen kuşların önemli göç yolları üzerinde bulunması ve ülkemizde yaklaşık 500 sulak alanın bulunması, bunlardan 150'sinin de uluslararası öneme sahip kuş alanları olması dikkate alındığında, Türkiye'nin tamamına yakın bir kısmının bu hastalığın riski altında olduğu ve bundan sonra da olacağı görülmektedir. Buna bağlı olarak virus, hayvanlar arasında hastalığa neden olmaya devam ettiği sürece insandan insana bulaşabilen yeni bir virusun oluşma riski de her zaman olacaktır.

Surveylans ve virusun tespiti, hastalıktan korunma için önemli bir bileşendir. Dünyanın her tarafındaki yabani kuş popülasyonunda sürekli olarak yapılan survey çalışmaları ile çevredeki influenza A viruslarının prevalansı izlenebilir ve sirküle olan virusların patojenik ve antijenik özellikleri tespit edilebilir. Bu sayede virus sadece sulak alanlarda iken hastalık için erken uyarı olanağı gelişecek, virusun kümes hayvanlarına ve çevreye yayılması tehdidine karşı engellenmesine yardımcı olacak ve kanatlılar arasında hastalığın takibini ve kontrolünü yapmak kolaylaşacaktır.

Bu pilot çalışma çok önemli sonuçların elde edildiği öncü bir çalışma olmuştur. Öncelikle, Türk

Ornitologlar daha önce çok temel düzeyde olan su kuşlarını yakalama ve halkalama, örnek alma ve gönderme konularındaki deneyimlerini önemli ölçüde arttırmışlardır. Bu pilot projenin belki de en önemli yanı, Veteriner Hekimlerle Ornitologların gelecekte yaşanabilecek olası bir vakada nasıl bir işbirliği içinde çalışması gerektiğini ve gelecekte hangi hatalarla karşılaşılacağını gösteren bir saha tatbikatı fırsatı yaratmış olmasıdır. Yabani kuşların Avian Influenza virusünü yaymadaki rolleri tam olarak bilinmediği için gelecekte yeni örnek-leme çalışmalarına gerek duyulacağı açıktır. Gelecekteki benzer çalışmalar için bu pilot proje çok değerli bir temel deneyim işlevi görecektir ve bu sayede gelecekteki çalışmalar daha az sorunla, daha rahat ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilecektir.

Sonuç olarak bu çalışmada; alınan örneklerin hiç birisinde HPAI H5N1 virusu tespit edilmemiş, sadece LPAI virusları tespit edilmiştir. Düşük Patojen Avian Influenza virusları genellikle embriyolu tavuk yumurtasında çoğalamamakta, bunların izolasyonlarında hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır (45). Yapılan Real-Time RT-PCR testlerinde pozitif ve şüpheli bulunan örneklerden embriyolu tavuk yumurtasında virus izole edilememesi, bu örneklerdeki virusların canlılıklarını yitirmiş olmalarını ya da LPAI içerebileceklerini göstermektedir. İzolasyonu yapılan ve H12N2 olarak tiplendirilen virusun da yapılan patojenite testlerinde LPAI virusu olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Alexander, D.J.** (2000) *A review of avian influenza in different bird species*. Proceedings of the ESVV Symposium on Animal Influenza Viruses, Gent 1999. Vet. Microbiol., 74: 3-13.
2. **Alfonso, C.P., Cowen, B.S., Van Campen, H.** (1995) *Influenza A viruses isolated from waterfowl in two wildlife management areas of Pennsylvania*. J. Wildl. Dis., 31 (2): 179-185.
3. **Arzey, G.** (2004) *The role of wild aquatic birds in the epidemiology of Avian Influenza in Australia*. Aust. Vet. J., 82: 277-388.
4. **Bankowski, R.A.** (1981) *Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza*. pp: 1–215. U.S. Animal Health Association, Richmond, Virginia.
5. **Becker, W.B.** (1966) *The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa—1961*. J. Hyg. (Lond.), 64: 309–320.
6. **Boynukara, B., Adızel, Ö., İlhan, Z., Ekin, İ.H., Aksaka, A., Çöven, F., Solmaz, H., Gülhan, T., Ögün, E., Durmuş, A., Gürtürk, K.** (2009) *Determination of Avian Influenza A viruses in some avian species in Van Lake basin by RT-PCR, their isolation and subtyping* (Third presenting of data). p:116. 3rd Epizone Annual Meeting, Crossing Borders, Antalya, Turkey.
7. **Brown, J.D., Swayne, D.E., Cooper, R.J., Burns, R.E., Stallknecht, D.E.** (2007) *Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water*. Avian Dis., 51: 285–289.
8. **Capua, I., Alexander, D.J.** (2007) *Avian influenza infections in birds- a moving target*. Influenza and Other Respiratory Viruses, 1 (1): 11-18.
9. **Capua, I., Marangon, S.** (2000) *The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review*. Avian pathology: journal of the W.V.P.A 2000; 29 (4): 289-94.
10. **Capua I., Mutinelli F.** (2001) *Mortality in Muscovy ducks (Cairina moschata) and domestic geese (Anser anser vnr domestica) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype*. Avian Pathol., 30 (2): 179-83.
11. **Capua, I., Mutinelli, F., Pozza, M.D., Donatelli, I., Puzelli, S., Cancellotti, F.M.** (2002) *The 1999–2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications*. Acta Tropica, 83: 7–11.
12. **Chen, H., Smith, G.J.D., Zhang, S.Y., Qin, K.J., Wang, K.S., Li, R.G., Webster, J., Peiris, S.M., Guan, Y.** (2005) *H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl: a worrying development could help to spread this dangerous virus beyond its stronghold in southeast Asia*. Nature (London), 436: 191–192.
13. **Choi, Y.K.T.D., Nguyen, H., Ozaki, R.J., Webby, P., Puthavathana, C., Buranathal, A., Chaisingh, P., Auewarakul, N.T.H., Hanh, S.K., Ma, P.Y., Hui, Y., Guan, J., Peiris, Sr., R.G. Webster.** (2005) *Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004*. J. Virol., 79: 10821–10825.
14. **Çöven, F.** (2006) *The situation of highly pathogenic avian influenza (HPAI) outbreaks in Turkey*. J. Vet. Med., Series B, 53: 34.
15. **Çöven, F.** (2010) *Türkiye’de avian influenza’nın son durumu ve retrospektif bir değerlendirme*. 87-88. 1. Uluslararası Katılımlı Veteriner Hekimliği Kongresi Kitapçığı. 3-6 Haziran 2010, İstanbul, Türkiye.
16. **Çöven, F., Orhan, G., Türe Göksu, O., Çöven, N., Karahan, G., Aşıklar, B.** (2005) *Türkiye’de avian influenza’nın virolojik ve serolojik olarak izlenmesi*. 14. Dünya Tavukçuluk Kongresi Özet Kitapçığı 210, Ağustos, İstanbul, Türkiye.
17. **Delogu, M., De Marco, M.A., Donatelli, I., Campitelli, L., Catelli, E.** (2003) *Ecological aspects of influenza A virus circulation in wild birds of the*

- Western Palearctic*. Vet. Res. Commun., 27 Suppl., 1: 101-106.
18. **Easterday, B.C.** (1987) *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*. pp: 1–475. U.S. Animal Health Association, Richmond, Virginia.
 19. **Easterday, B.C., Beard, C.W.** (1992) *Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza*. pp: 1–458. U.S. Animal Health Association, Richmond, Virginia.
 20. **Easterday, B.C., Trainer, D.O., Tumova, B., Pereira, H.G.** (1968) *Evidence of infection with influenza viruses in migratory waterfowl*. Nature, 219: 523–524.
 21. **Ellis, T.M., Barry, B.R., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Luk, G.S.M., Tsim, S.T., Sturm-Ramirez, K., Webster, R.G., Guan, Y., Peiris, J.S.M.** (2004) *Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002*. Avian Pathol., 33: 492–505.
 22. **Englund, L., Klingeborn, B., Mejerland, T.** (1986) *Avian influenza A virus causing an outbreak of contagious interstitial pneumonia in mink*. Acta. Vet. Scand., 27: 497–504.
 23. **FAO** (2006). *Summary of confirmed HPAI outbreaks in affected countries*. FAO AIDE News—AI Bulletin, 41: 9–10.
 24. **Hayvan Sağlık Zabıtası Kanunu** (Kanun No:3285). Erişim: <http://www.kkgm.gov.tr/mev/kanun.html>, Erişim Tarihi: 10.05.2008.
 25. **Hinshaw, V.S., Nettles, V.F., Schorr, L.F., Wood, J.M., Webster, R.G.** (1986) *Influenza virus surveillance in waterfowl in Pennsylvania after the H5N2 avian outbreak*. Avian Dis., 30 (1): 207-212.
 26. **Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier Ron, A.M., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D.M.E., Poovorawan. Y.** (2004) *Avian influenza H5N1 in tigers and leopards*. Emerg. Infec. Dis., 10: 2189–2191.
 27. **Kuiken, T., Rimmelzwaan, G., Van Riel, D., Van Amerongen, G., Baars, M., Fouchier, R., Osterhaus, A.** (2004) *Avian H5N1 influenza in cats*. Science, 306: 241.
 28. **Lvov, D.K., Zdanov, V.M., Sazonov, A.A., Braude, N.A., Vladimirtceva, E.A., Agafonova, L.V., Skljanskaja, E.I., Kaverin, N.V., Reznik, V.I., Pysina, T.V., Oserovic, A.M., Berzin, A.A., Mjasnikova, I.A., Podcernjaeva, R.Y., Klimenko, S.M., Andrejev, V.P., Yakhno. M.A.** (1978) *Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales*. Bull. World Health Organ., 56 (6): 923–930.
 29. **Marinus, Van D.E.** (2008) *Monitoring of wild life and its importance for influenza control*. International Avian Influenza Congress, 139-142. 03-04 September 2007, Antalya, Turkey.
 30. **Morgan, I.R., Westbury, H.A.** (1981) *Virological studies of Adelie Penguins (Pygoscelis adeliae) in Antarctica*. Avian Dis., 25: 1019–1026.
 31. **Nishiguchi, A., Yamamoto, T., Tsutsui, T., Sugizaki, T., Mase, M., Tsukamoto, K., Ito, T., Terakado, N.** (2005) *Control of an outbreak of highly pathogenic avian influenza, caused by the virus sub-type H5N1 in Japan in 2004*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 24 (3): 933-944.
 32. **OIE (Office International des Epizooties)** (2005) *Highly pathogenic avian influenza in TURKEY*. Erişim:http://www.oie.int/eng/info/heβδο/AIS_49.H TM. Erişim Tarihi:13.05.2008.
 33. **OIE (Office International des Epizooties)** (2006) Erişim: http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm Erişim Tarihi: 13.05.2008.
 34. **OIE (Office International des Epizooties)** (2007). *Avian Influenza*. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. 1-20. Erişim: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf, Erişim Tarihi: 06.05.2008.
 35. **Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M.** (2006) *Global patterns of Influenza A viruses in wild birds*. Science, 312: 384-388.
 36. **Perkins, L.E.L., Swayne, D.E.** (2003) *Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus*. Avian Dis., 47: 956–967.
 37. **Robertson, S.I., Bell, D.J., Smith, G.J.D., Nicholls, J.M., Chan, K.H., Nguyen, D.T., Tran, P.Q., Streicher, U., Poon, L.L.M., Chen, H., Horby, P., Guardo, M., Guan, Y. Peiris, J.S.M.** (2006) *Avian influenza H5N1 in viverrids: implications for wildlife health and conservation*. Proc. R. Soc. B., 273: 1729–1732.

38. Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Tanabayashi, K., Hotta, A., Saito, T., Yamada, A., Kobayashi, M. (2004) *Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 75 (2): 327–332.
39. Sims, L.D., Domenech, J., Benigno, C., Kahn, S., Kamata, A., Lubroth, J., Martin, V., Roeder, P. (2005) *Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia*. Vet. Rec., 157: 159–164.
40. Sims, L.D., Ellis, T.M., Liu, K.K., Dyrting, K., Wong, H., Peiris, M., Guan, Y., Shortridge, K.E. (2003) *Avian influenza in Hong Kong 1997–2002*. Avian Dis., 47: 832–838.
41. Sims, L.D., Guan, Y., Ellis, T.M., Liu, K.K., Dyrting, K., Wong, H., Kung, N.Y.H., Shortridge, K.F., Peiris, M. (2003) *An update on avian influenza in Hong Kong 2002*. Avian Dis., 47: 1083–1086.
42. Songserm, T.A., Amonsin, R., Jam-on, N., Sae-Heng, N., Pariyothorn, S., Payungpom, A., Theambooniers, S., Chutinimitkul, R., Thanawongnuwech, R., Poovorawan, Y. (2006) *Fatal avian influenza A H5N1 in a dog*. Emerg. Infec. Dis., 12: 1744–1747.
43. Spackman, E., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Winker, K., Suarez, D.L., Scott, M., Swayne, D.E. (2005) *Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation*. Virus Res., 114: 89–100.
44. Stallknecht, D.E. (1998) *Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc.* 61–69. In: Swayne, D.E., Slemons, R.D. (Eds): *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*, U.S. Animal Health Association, Richmond, Virginia.
45. Swayne, D.E., Halvorson, D.A. (2003) *Influenza*. 153-184. In: Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E., Saif, Y.M. (Eds): *Diseases of Poultry*. 11 th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
46. Swayne, D.E., Slemons, R.D. (1998) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*. pp: 1–401. U.S. Animal Health Association, Richmond, Virginia.
47. Swayne, D.E., Suarez, D.L. (2000) *Highly pathogenic avian influenza*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 19: 463–482.
48. Tollis, M., Di Tirani, L. (2002) *Recent developments in avian influenza research: Epidemiology and immunoprophylaxis*. Vet. J., 164: 202-215.
49. Tumpey, T.M., Alvarez, R., Swayne, D.E., Suarez, D.L. (2005) *Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus*. J. Clin. Microbiol., 43 (2): 676-683.
50. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1992) *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol. Rev., 56: 152–179.
51. Webster, R.G., Guan, Y., Poon, L., Krauss, S., Webby, R., Govorkova, E., Peiris, M. (2005) *The spread of the H5N1 bird flu epidemic in Asia in 2004*. Arch. Virol. Suppl., 19: 117–129.
52. **Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge**. Avian Influenza Virus Neurominidase Inhibition Test Protokolü.
53. **WHO (World Health Organization)** (2007) *Confirmed human cases of avian influenza*. Erişim: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/, Erişim Tarihi:05.05.2010.
54. **Yingst, S.L., Saad, M.D., Felt, S.A.** (2006) *Qinghai-like H5N1 viral diseases from domestic cats, northern Iraq*. Emerg. Infec. Dis., 12: 1295–1297.

Yazışma Adresi:

Uzm. Vet. Hek. Dr. Fethiye ÇÖVEN
 Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
 Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı
 35010 Bornova-İZMİR
 E-mail: covenfethiye@yahoo.com

ENTANSİF BROYLER İŞLETMELERİ İLE KIRSAL TAVUKÇULUK İŞLETMELERİNDEKİ HAYVANLARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROKOKLARIN FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR*

STUDIES ON PHENOTYPING AND GENOTYPING CHARACTERIZATION OF *ENTEROCOCCUS SPP.* ISOLATED FROM ENTANSIVE BROILER FARMS AND RURAL POULTRY ESTABLISHMENTS

Zahide DİLİK¹

Ersin İSTANBULLUOĐLU²

Geliş Tarihi (Received): 17.09.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 08.11.2010

ÖZET

Ticari broyler işletmelerinden 400, köy tavuklarından 304 kloakal sıvap örnekleri toplandı. İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucuna göre enterokok suşlarının % 54.3'ünün *Enterococcus faecium*, % 22.3'ünün *E. gallinarum*, % 14.7'sinin *E. faecalis*, % 4.3'ünün *E. mundti*, % 1.6'sının *E. casseliflavus*, % 1'inin *E. raffinosus*, % 1'inin *E. durans*, % 0.2'sinin *E. solitarius* ve % 0.2'sinin *E. hirae* türlerine ait olduğu belirlendi. Broyler işletmelerinden izole edilen enterokok suşlarının penisiline % 5.6, tetrasikline % 72, eritromisine % 59.3, enrofloksasine % 8.7, kinopristin/dalfopristine % 33.6, rifampine % 10.9, vankomisine % 0.4, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine % 6.5 ve % 23.1 oranında dirençli oldukları saptandı. Suşların % 100'ünün ise linezolid ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu bulundu. Köy tavuklarından izole edilen enterokok suşlarının tetrasiklin, eritromisin, enrofloksasin ve kinopristin/dalfopristin dirençlilikleri sırasıyla % 2, % 2, % 1.3 ve % 4.8 olarak saptandı. Tüm suşların linezolid, gentamisin, streptomisin, penisilin, vankomisin, teikoplanin ve rifampine duyarlı olduğu belirlendi. Tekli ve çoklu antibiyotik dirençli 50 enterokok suşunun plazmid profili belirlendi. Plazmid varlığı saptanan 22 (% 44) enterokok izolatında 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb büyüklüğünde sekiz farklı plazmidin bulunduğu ve bunların dokuz plazmid paternine ayrıldıkları belirlendi. Elli enterokok izolatının 28'inin (% 56) plazmid saptanamadı.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, *Enterococcus*, fenotipik özellik, plazmid profili, tavuk.

SUMMARY

Cloacal swabs were collected 400 entansive broiler farms and 304 rural poultry. According to isolation and identification results, enterococcus isolates consisted of 54.3 % *E. faecium*, 22.3 % *E. gallinarum*, 14.7 % *E. faecalis*, 4.3 % *E. mundti*, 1.6 % *E. casseliflavus*, 1 % *E. raffinosus*, 1 % *E. durans*, 0.2 % *E. solitarius* and 0.2 % *E. hirae*. 5.6 % of broiler enterococci strains were found to be resistant to penicillin, 72 % were resistant to tetracycline, 59.3 % were resistant to erythromycin, 8.7 % were resistant to enrofloxacin, 33.6 % were resistant to quinupristin/dalfopristin, 10.9 % were resistant to rifampin, 0.4 % were resistant to vancomycin, 6.5 % and 23.1 % were resistant to high level streptomycin and gentamicin. Teicoplanin and linezolid susceptibility of enterococcus isolates was found in 100 %. 2 %, 2 %, 1.3 % and 4.8 % of rural enterococci strains were resistant to tetracycline, erythromycin, enrofloxacin and quinupristin/dalfopristin respectively. All the *Enterococcus spp.* were found to be sensitive against linezolid, gentamicin, streptomycin, penicillin, vancomycin, teicoplanin and rifampin of antibiotics. Plasmid profiling of 50 single and multiple antibiotic resistant enterococcus isolates were determined. 22 (44 %) *Enterococcus* isolates possessed nine different plasmid patterns having 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb respectively. 28 isolated (56 %) enterococcus did not have any plasmid.

Key words: Antibiotic resistance, *Enterococcus*, fenotyping features, plasmid profiling, chicken.

* Birinci yazarın Doktora Tezinden özetlenmiştir.

¹ Dr. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü.

² Prof. Dr. Veteriner Hekim, Kıbrıs.

GİRİŞ

Enterokoklar, Gram pozitif ve katalaz negatif koklar olup, ekosistem içinde toprakta, suda, bitkilerde, gıdalarda, hayvanların ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında bulunurlar. Enterokoklar fırsatçı patojenler olup beslenme ve bakım şartlarının uygun olmadığı hayvanlarda septisemi, üriner sistem infeksiyonu, endokardit, ishal ve otitis eksternaya neden olabilirler. Enterokokların insanlarda ve bilhassa stres altındaki; immun sistemi zayıf olan bireylerde de üriner sistem infeksiyonları, endokardit, menenjit, bakteriyemi ve cerrahi yara infeksiyonlarına sebep oldukları belirtilmiştir (12, 18, 24, 36).

Enterokoklar çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdiği gerek, intrinsik direnç özellikleri gerekse, mutasyon ve genetik madde aktarımı sonucu kazandıkları antibiyotik direnç özellikleri ve betalaktamaz aktiviteleri ile her türlü ortamda canlılıklarını sürdürebilme yeteneklerinden dolayı nozokomiyal patojenler arasında yerlerini almıştır (4).

Broyler rasyonlarına gerek büyütme, gerekse tedavi ve koruyucu amaçlı olarak katılan antibiyotikler, antimikrobiyal dirençli *Enterococcus spp.*'nin selektif seçilmesine neden olmuştur. Enterokoklar, sahip oldukları antimikrobiyal direnç genlerini, plazmid ve transpozonlar aracılığı ile ekosistem içerisinde, insanlar için patojen olan *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.* ve *Streptococcus spp.* gibi Gram pozitif bakterilere transfer edebildikleri ortaya konulmuştur (2, 28, 38). Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda, tavukların, insanlarda hastane infeksiyonlarına sebep olan antibiyotik dirençli enterokoklar için potansiyel rezervuar olduğu ortaya konulmuştur (13).

Bu çalışmada, broyler ve köy tavuklarının bağırsak florasındaki *Enterococcus* türlerinin varlığı, yaygınlığı, biotipleri ve izole edilen suşların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik özellikleri ile plazmid profillerinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Ankara ve Kırıkkale ili çevresinde bulunan ticari broyler işletmeleri ve köy tavukları kümesleri Mayıs 2005 ve Kasım 2005 tarihleri arasında ziyaret edildi. Büyük kapasiteli 4 ticari broyler işletmesinden 400 örnek, kümeslerinin bütünlüğünü temsil edecek şekilde 1-2 metre aralıklarla kümesin her noktasından rastgele tutulan 4-5 haftalık broylerin kloakasından steril sıvap ile alındı. Kapasitesi 10-50 adet arasında değişen 19 köy tavuğu kümesinden 304 örnek ise kümeste bulunan bütün tavukların kloakasından steril sıvap ile alındı. Her iki tip kümeden alınan dışkı örnekleri soğuk zincirde en kısa zamanda laboratuvara getirildi.

Laboratuvara getirilen kloakal svap örnekleri, Slanetz-Bartley agar besiyerine ekilerek 44-45° C'de aerobik koşullarda 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen vişne renkli koloniler seçilerek identifikasyon çalışmaları için Brain Heart Infusion Agar besi yerine pasajları yapıldı. İzole edilen enterokok şüpheli izolatları Gram boyama, katalaz testi, safra eskülin testi, Pirolidonil-β-naftilamid (PYR) testi, % 6.5' luk tuzlu ortamda (NaCl) üreme testi uygulanarak *Enterococcus spp.* olarak cins düzeyinde adlandırıldı. *Enterococcus spp.* suşlarının tür düzeyinde identifikasyonları için arjinin, hareket, pigmentasyon, piruvat ve karbonhidrat fermentasyon testlerinden yararlanıldı (11). İdentifiye edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları/dirençlilikleri CLSI'nın (Clinical Laboratory Standarts Institute) belirttiği kriterlere göre Müeller Hinton Agar'da disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirildi (7). Çeşitli antibiyotiklere dirençli 43 broyler ve 7 köy tavuğu enterokok suşlarının plazmidleri, alkaline lysis yöntemi ile izole edilerek, agar jel elektroforezde plazmid profillerinin tespiti yapıldı (43).

BULGULAR

Dörtüyz broyler örneğinden 229 (% 57.25) ve 304 köy tavuğu örneğinden ise 143 adet (% 47.03) enterokok suşu izole edildi. Broyler ve köy tavuklarından izole edilen 372 enterokok suşunun tür dağılımları Tablo 1'de sunuldu.

Broyler enterokok suşlarının penisiline % 5.6, tetrasikline % 72, eritromisine % 59.3, enrofloksasine

Tablo 1. Enterokok suşlarının orijini, biyotipleri ve dağılım oranları.

Mikroorganizmalar	Broylar		Köy Tavukları		Toplam	
	Dışkı (adet)	Oran %	Dışkı (adet)	Oran %	Dışkı (adet)	Oran %
<i>E.faecalis</i>	42	18.34	13	9.09	55	14.78
<i>E.faecium</i>	97	42.35	105	73.42	202	54.30
<i>E.gallinarum</i>	80	34.93	3	2.09	83	22.31
<i>E.casseliflavus</i>	5	2.18	1	0.69	6	1.61
<i>E.raffinosis</i>	2	0.87	2	1.39	4	1.07
<i>E.mundtii</i>	1	0.43	15	10.48	16	4.30
<i>E.durans</i>	1	0.43	3	2.09	4	1.07
<i>E.solitarius</i>	1	0.43	-	-	1	0.2
<i>E.hirae</i>	-	-	1	0.69	1	0.2
Toplam	229	57.25	143	47.03	372	52.8

% 8.7, rifampine % 10.9, vankomisine % 0.4, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine % 6.5 ve % 23.1 oranında dirençli oldukları saptandı. Suşların % 100'ünün ise linezolid ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu bulundu. Broylar *E. faecalis* izolatlarının kinopristin/dalfopristine % 90.4 (38/42 adet) dirençli ve % 9.5 (4 adet) orta duyarlı, *E. faecium* izolatlarının kinopristin/dalfopristine % 21.6 (21/97 adet) dirençli, diğer enterokok suşlarının ise % 20 (18/90 adet) oranında dirençli olduğu saptandı. Broylar enterokok suşlarının tümünün (77/229 adet) % 33.6 oranında kinopristin/dalfopristine dirençli olduğu belirlendi.

İkiyüz yirmi dokuz broylar enterokok suşunun 179'unun (% 78.1) tekli veya çoklu antibiyotik dirençli olduğu tespit edildi. Enterokok suşlarının 53'ünün (% 23.1) tek, 47'sinin (% 20.5) iki, 40'inin (% 17.4) üç, 19'unun (% 8.2) dört, 11'inin (% 4.8) beş ve 9'unun ise (% 3.9) altı antibiyotiğe dirençli oldukları belirlendi. Çoklu antibiyotik direnci en fazla *E. faecium*, *E. gallinarum* ve *E. faecalis* türlerinde saptandı.

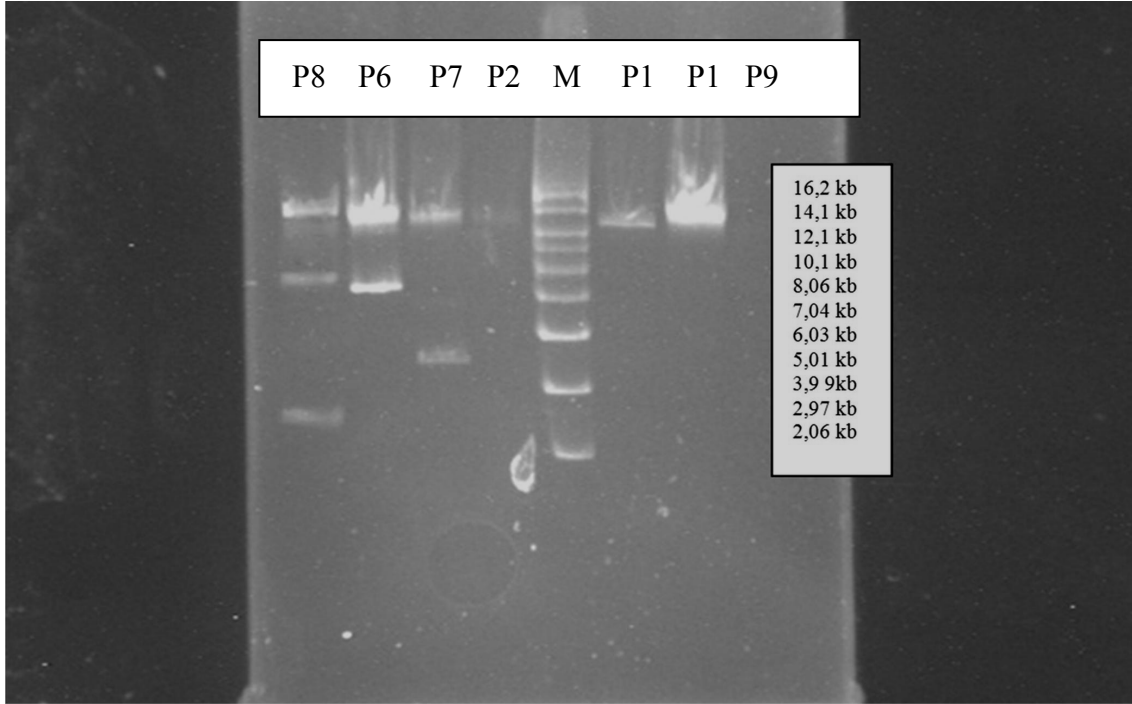
Köy tavuklarından izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline % 2, eritromisine % 2, enrofloksasine % 1.3 oranında dirençli olduğu saptandı. Tüm suşların linezolid, gentamisin, streptomisin, penisilin, vankomisin, teikoplanin ve rifampin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlendi. Köy tavukları *E. faecalis* izolatlarının % 53.8'inin (7/13) kinopristin/dalfopristine dirençli, % 23'ünün (3) orta duyarlı olduğu belirlendi. Diğer enterokok

türlerinin kinopristin/dalfopristine karşı duyarlı olduğu görüldü. Köy tavukları enterokok suşlarının tümünün (7/143) % 4.8 oranında kinopristin/dalfopristine dirençli olduğu belirlendi. Yüz kırk üç köy tavuğu enterokok suşlarından 15'inin (% 10.4) de tek antibiyotiğe dirençli olduğu saptandı.

Plazmid profilleri incelenen 50 enterokok suşunun 28'sinde (% 56) plazmid saptanamadı. Plazmid izole edilen enterokok suşunun 22 (% 44)'sinde 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb, 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb'lık sekiz farklı büyüklükte plazmid belirlendi ve bunların 9 plazmid paternine ayrıldıkları görüldü. Plazmid paternleri P1....P9 olarak ifade edildi. İzolatlarda 1 ile 3 arasında değişen plazmid varlığı tespit edildi (Şekil 1).

Tek, iki, üç, dört, beş ve altı antibiyotiğe direnç gösteren 43 broylar kökenli enterokok suşunun 21'inde (% 48.8) plazmid bantları görüldü. Enterokok izolatlarının 8'inde 8.06 kb (patern 1, P1), 2'sinde 10.10 kb (P2), 5'inde 12.13 kb (P3), 1'inde 16.21 kb (P4) büyüklüğünde tek plazmid, 1'inde 12.13 kb ve 2.99 kb olmak üzere iki plazmid (P5), 2'sinde 12.13 kb ve 5.01 kb'lık iki plazmid (P6), 1'inde 16.21 kb ve 3.99 kb'lık iki plazmid (P7) ve 1'inde 2.06 kb, 10.10 kb ve 16.21 kb'lık üç plazmid (P8) belirlendi. Broylar enterokok suşunun 22'sinde plazmid bantı (P9) görülmedi. Köy tavuklarından izole edilen antibiyotik dirençli 7 enterokok suşunun 1'inde 10.10 kb'lık tek plazmid bantı (Patern 2, P2) olduğu görüldü.

M: Markır, P1-P2: Tek plazmid bantı, P6-P7: İki plazmid bantı P8: Üç plazmid bantı P9: Plazmid bantı yok



Şekil 1. Enterokok suşlarının agar jel elektroforezde plazmid profilleri.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Devriese ve ark. (9), bir günlük civcivlerin intestinal florasında *E. faecium* ve *E. faecalis*'i predominant (aynı oranlarda, % 41) tür olarak tespit etmişlerdir. 3-4 haftalık tavukların intestinal florasında ise (% 46) *E. faecium*'u dominant tür olarak belirlenmiş, aynı zamanda *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. cecorum*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* türlerini de tanımlamışlardır. 12 haftalıktan büyük tavukların intestinal florasında ise predominant olarak (% 50) *E. cecorum* türünü tespit etmişlerdir. Bu çalışmada broyler kloakal sıvı örnekleri 4-5 haftalık iken alınmış olup *E. faecium* dominant tür olarak bulundu ve bunu diğer türler takip etti. Bu sonuçlar enterokokkal floradaki türlerin tavukların belirli yaş dönemlerinde değiştiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan bu çalışmadaki köy tavukları örneği 12 haftalıktan büyük tavuklardan alınmasına karşın predominant tür olarak *E. faecium* bulundu. *E. cecorum* türü bulunamadı. Bunun nedeni *E. cecorum*'un izolasyonunun zor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durumu Devriese ve ark. (9), grup D antijeninden yoksun olan *E. cecorum*'un, % 0.3 sodyum azid içeren besiyerlerinde üreyemedikleri ve CO₂ ile

zenginleştirilmiş ortamlarda üreyebildikleri şeklinde açıklamışlardır. Çalışmamızda ise izolasyon için kullanılan besi yeri % 0.4 sodyum azid içermekteydi ve CO₂ ile zenginleştirilmiş ortam kullanılmadı.

Japonya'da broyler gaitalarından % 44.8 *E. faecium*, % 22.8 *E. faecalis*, % 12.9 *E. hirae*, % 6.7 *E. durans*, % 1.1 *E. casseliflavus*, % 0.5 *E. gallinarum* türleri (49), Danimarka ve İsveç tavukları dışkılarından % 54 ve % 77 *E. faecium*, % 18-20 *E. faecalis*, % 9-% 5 *E. gallinarum*, % 2-% 2 *E. hirae*, % 4-% 0 *E. malodoratus*, % 5-% 0 *E. pseudoavium*, % 0-% 1 *E. raffinosus*, % 0-% 1 *E. avium*, % 0-% 1 *E. dispar* türleri (35), Bostwana'da tavuk örneğinden % 46.9 *E. faecalis*, % 32.9 *E. faecium*, % 7.9 *E. casseliflavus*, % 7 *E. gallinarum* ve % 5.3 *E. avium* türleri (6), Maryland doğu sahil kıyılarındaki tavuk çiftliklerinden % 53.4 *E. faecalis*, % 31.4 *E. faecium*, % 6.0 *E. gallinarum*, % 3.9 *E. hirae*, % 1.5 *E. durans*, % 1.2 *E. casseliflavus* ve % 0.3 *E. avium* türleri tanımlanmıştır (14). Bu çalışmadaki broyler örneklerinden % 42.35 *E. faecium*, % 34.93 *E. gallinarum*, % 18.34 *E. faecalis*, % 2.18 *E. casseliflavus*, % 0.87 *E. raffinosus*, % 0.43 *E. durans*, % 0.43 *E. solitarius*

ve % 0.43 *E. mundtii* türleri tanıfiye edildi. Enterokok tür dağılımının farklılık göstermesi, çalışmaların değişik coğrafik bölgelerde yapılmasından ve izolasyon metotlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Tejedor-Junco ve ark. (44), İspanya'da yaptıkları çalışmada tavuk dışkılarından *E. faecalis* (% 63.6), *E. mundtii* (% 12.7), *E. faecium* (% 9.1), *E. casseliflavus* (% 7.3), *E. durans* (% 3.7) ve *E. hirae* (% 3.6) türlerini tanıfiye ettiklerini, fakat tavuk orijinli olmasına rağmen *E. gallinarum* ve *E. avium* türlerini tanıfiye edemediklerini bildirmişlerdir. Bunun sebebini izolasyon aşamasında bütün kolonilerin birbirine çok benzemesinden dolayı bazı türlerin varlığının gözden kaçabileceği şeklinde açıklamışlardır. Bu çalışmada da % 34.93 *E. gallinarum* türü tanıfiye edilmesine karşın *E. avium* türü tanıfiye edilemedi.

Bu çalışmada köy tavukları gaita örneklerinden % 73.42 *E. faecium*, % 10.48 *E. mundtii*, % 9.09 *E. faecalis*, % 2.09 *E. gallinarum*, % 2.09 *E. durans*, % 1.39 *E. raffinosus*, % 0.69 *E. casseliflavus* ve % 0.69 *E. hirae* türleri saptandı. Köy tavuklarında *E. mundtii* türü % 10.48, broylerde ise % 0.43 oranında bulundu. Köy tavuklarında *E. mundtii* türünün yüksek çıkması, bu türün bitki ve toprak orijinli olmasından ve köy tavuklarının doğal bitkilerle beslenmesinden kaynaklanabilir.

Tavukların enterokokkal florasının coğrafik bölgelere, yaş ve izolasyon metotlarının farklılıklarına göre sıklıklarının değişebilmesine karşın belirli türleri içerdiği bildirilmiştir (9, 14, 20). Bu çalışmada tanıfiye edilen enterokok türlerinin dağılımı insanlarda hastalıklara neden olan türlere benzerlikleri bakımından önem taşımaktadır. İnsanlarda enterokok infeksiyonlarını % 85-89'nu *E. faecalis*, % 10-15'ni *E. faecium*, % 5'ten az oranda *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. avium* ve *E. raffinosus* türleri oluşturmaktadır (26).

Tıp ve Veteriner Hekimlik alanında antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu oluşan antimikrobiyal direnç dünya çapında önemli bir problem haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnç oranındaki artışlar, sadece patojenik bakterilerde değil aynı zamanda kommensal bakterilerde de görülmek-

tedir. Bu kommensal bakteriler, patojenik bakteriler için önemli bir direnç gen rezervuarları olmuştur (30).

Hayvanlarda antibiyotiklerin yaygın kullanımı hayvanların intestinal florasına dirençli suşların yerleşmesine neden olmaktadır. Hayvansal kökenli çoğul dirençli flora bakterileri insanlara direkt yolla veya hayvansal gıdalar aracılığı ile bulaşabilmektedir. Bu antibiyotik dirençli suşların insanlara bulaşması sonucu meydana gelebilecek infeksiyonların tedavilerinin güçleşmesine neden olmaktadır. Özellikle vankomisin dirençli enterokoklar halk sağlığında önemli bir global sorun haline gelmiştir (30, 45).

Kaya ve ark. (22), tavuk intestinal sisteminden izole ettikleri enterokok suşlarının streptomisine % 65, tetrasikline % 55, eritromisine % 45, klindamisine % 39, yüksek düzey aminoglikozide % 17.5, kloramfenikole % 9, siprofloksasine % 9 ve penisiline % 1.2 oranında dirençli olduklarını tespit etmiştir. Çelik (8), yaptığı çalışmada enterokok suşlarının (tavuk - köpek orijinli) streptomisine % 73, ampisiline % 53.8, gentamisine % 34.6, tetrasikline % 30.7, eritromisine % 7.6 oranında dirençli olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada ise ticari broyler çiftliklerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline % 72, eritromisine % 59.3, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine % 6.5 ve % 23.1, enrofloksasine % 8.7, penisiline % 5.6 oranında dirençli oldukları tespit edildi. Tetrasiklin, makrolid, aminoglikozid ve betalaktam grubu antibiyotiklerin geniş spektrumlu olması, büyümeyi hızlandırma (tylosin, oksitetrasiklin) veya tedavi amaçlı uzun yıllar kullanılması sonucu antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmuştur. Enterokok suşlarının aynı antibiyotiklere karşı direnç oranlarının çiftliklere göre farklılık göstermesinin bu antibiyotiklerin yoğun veya az kullanımından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (32, 46).

Şili'deki ticari tavuk işletmelerindeki dışkılarından izole edilen enterokokların tetrasikline % 81.2, eritromisine % 64.5, streptomisine % 22.9, penisiline % 17.7 ve gentamisine % 5.2 oranında dirençli (32), Portekiz'de 2004 yılında toplanan tavuk dışkı örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline % 97, eritromisine % 87.5, siprofloksasine % 12.5, ampisiline % 10.5, streptomisine % 2

ve gentamisine % 1 oranında dirençli (34), Çek Cumhuriyeti'nde tavuk enterokok izolatlarının tetrasikline % 80, eritromisine % 59, yüksek düzey streptomisine % 22 ve yüksek düzey gentamisine % 7 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (25). Bu çalışmada ticari broyler işletmelerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı direnç oranlarının diğer ülkelere göre düşük olduğu, gentamisin antibiyotiğine karşı ise direnç oranının yüksek olduğu belirlendi. Ticari broyler işletmelerindeki enterokokların antibiyotik direnç dağılım oranlarının ülkelere göre farklılık göstermesi, antibiyotik kullanım politikalarının ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada köy tavuklarından elde edilen enterokok suşlarının, tetrasikline % 2, eritromisine % 2, enroflaksasine % 1.39 oranında dirençli oldukları saptandı. Köy tavukları dışkı örnekleri antibiyotik kullanılmayan 10-50 adet arasında tavuk içeren kümeslerden toplandı. Köy tavukları yem katkı maddeleri içermeyen doğal besinlerle (buğday, arpa vb.) beslenmektedir. Bu çalışmada köy tavuklarında antibiyotik direnç oranlarının düşük düzeylerde olmasının nedeni dirençli suşların bakıcılardan ve diğer hayvanlardan bulaştığı düşünülmektedir.

Amerika ve Avrupa'da antibiyotiklerin büyük çoğunluğu hayvanlarda büyütme faktörü olarak kullanılmıştır (48). Geçmişten bugüne kadar basitrasinin, tylosin, monensin, salinomisin, spiramisin, tetrasiklin, virjinamisin, avilamisin, avoparsin, efrotomisin, olakuindoks ve karbadoks büyütme faktörü olarak kullanılmış antibiyotiklerdir (3). Bu antibiyotiklerin hayvan yemlerinde subterapötik dozlarda yaygın kullanımı sonucu bağırsak florasında bulunan bakterilerin bu antibiyotiklere karşı değişik mekanizmalarla direnç geliştirmeleri ve bu direnç genlerini başka bakterilere aktarabilmeleri sonucu dirençli suşların ortaya çıkması yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır (40).

Danimarka'da avoparsinin kullanımı sonucu aynı gruptan olan vankomisin ve teikoplanine karşı çapraz direnç oluşturması, Vankomisin dirençli enterokokların (VRE) saptanması, direncin transfer edilmesi, VRE'lerin seleksiyonuna neden olması

ve bu dirençli suşların gıdalar ile insanlara aktarılması gibi nedenlere dayanarak hayvanlarda avoparsin kullanımı 1995 yılında yasaklanmıştır (10). Hayvanlarda büyütme amaçlı kullanılan antibiyotiklerin insan hekimliğinde kullanılan aynı grup antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşturması sonucu insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğini korumak ve direnç gelişiminin önüne geçmek amacıyla Avrupa Birliği 1999 yılından itibaren avoparsine ek olarak, virjinamisin, basitrasinin, tylosin, spiramisin ve avilamisinin büyütme faktörü olarak kullanımını yasaklamıştır (5, 47). AB'deki uygulamalara paralel olarak Ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 09.07.1999 tarih ve 14428 sayılı yazısı ile 30.06.1999 tarihinden itibaren söz konusu antibiyotiklerden avoparsin, spiramisin, virjinamisin, tylosin fosfat, karbadoks, olakuindoks ve çinko basitrasinin yem katkı maddesi olarak kullanımını yasaklanmıştır (39).

Danimarka'da Heuer ve ark. (17), avoparsinin yasaklanmasından 5 yıl sonra broylerlerden ve broyler kümeslerindeki çevresel örneklerden % 74.5 oranında VRE'ler tespit etmiştir. Danimarka'da 1998 yılında yapılan bir çalışmada (1), VRE direnç oranının % 5'ten az oranda olduğu bildirilmiştir. Brezilya'da Sao Paulo'da 10 yıldır avoparsin kullanılan broyler çiftliğinden toplanan dışkı örneklerinden VRE'ler saptanmamıştır (29). Buna karşın Brezilya'dan Japonya'ya ihraç edilen tavuklarda VRE'ler tespit edilmiştir (19). Bu çalışmada ise bir adet vankomisin dirençli enterokok suşu saptandı. VRE oranlarının farklılık göstermesi izolasyon metodlarının farklılığından kaynaklandığı bildirilmiştir (31).

Yeni Zelanda'da avoparsinin yasaklanmasından iki yıl sonra broyler dışkılarındaki VRE oranının % 50'den % 5.8'e düştüğü (31), Tayvan'da, avoparsinin yasaklanmasından sonraki 2000-2003 yılları arasındaki broyler *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarındaki vankomisin direncinin % 13.4'ten % 3.7 ve % 3'ten % 0'a düştüğü tespit edilmiştir (27).

Çelik (8), tavuk (avoparsin kullanılan işletme) enterokok suşlarının vankomisin direncinin % 13.6 oranında olduğunu, Kaya ve ark. (22), tavuklarda vankomisin ve teikoplanin dirençli enterokok suşu bulunmadığını bildirmiştir. Bu çalışmada da

broyler vankomisin direnci % 0.4 oranında belirlendi. Ülkemizde ve diğer ülkelerde avoparsinin büyüme faktörü olarak kullanımının yasaklanmasından sonra zamanla enterokoklarda vankomisin direncinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir.

Danimarka'da 1995-1997 yılına kadar virjinamisin broyler çiftliklerindeki kullanımının artmasını takiben broylerlerdeki virjinamisin dirençli *E. faecium* oranı 1995 yılında % 27.3 iken 1997 yılında % 66.2 oranına çıkmıştır. 1999 yılında virjinamisin kullanımının yasaklanmasından sonraki 2000 yılında virjinamisin direnç oranının % 33,9 düzeylerine düştüğü tespit edilmiştir (1). Avrupa ülkelerindeki yasaklamalara rağmen İngiltere'de 2002-2003 yılları arasında yapılan bir çalışmada broylerlerde vankomisin dirençli *E. faecium* suşlarının kinopristin/dalfopristine direnç oranı % 50 olarak saptanmıştır (33). Portekiz'de 2004 yılında tavuk dışkılarından toplanan *E. faecium* izolatlarında % 33 oranında kinopristin/dalfopristin direnci olduğu bildirilmiştir (34). Virjinamisin kullanıldığı yıllarda kinopristin/dalfopristin direncinin yüksek olduğu, yasaklamalardan birkaç yıl sonra direnç oranlarının düştüğü görülmektedir (15).

Bu çalışmada, broyler *E. faecium* suşlarının % 21.6 (21/97) oranında kinopristin/dalfopristine dirençli, köy tavuklarından izole edilen *E. faecium* suşlarının ise duyarlı olduğu görüldü. Broyler *E. faecium* suşlarının kinopristin/dalfopristin direncinin düşük olması, ülkemizde virjinamisin kullanımının Avrupa ülkelerinden daha az oranda olmasına bağlı olabilir.

Hersberger ve ark. (16), ABD'de yaptıkları çalışmada virjinamisin kullanılan tavuk çiftliklerinden izole ettikleri *E. faecium* suşlarında kinopristin/dalfopristin direncinin % 85, antibiyotik kullanılmayan çiftliklerden izole edilen *E. faecium* suşlarında kinopristin/dalfopristin direncinin ise % 38 (6/16) oranlarında olduğunu tespit etmişlerdir. Antibiyotik kullanılmayan çiftliklerde düşük oranlarda direnç olmasının nedeninin çiftlikte çalışan insanların dirençli enterokokların çiftlikten çiftliğe yayılmasında potansiyel bir rezervuar rolü oynamasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (16). Antibiyotik dirençli enterokokların hayvanlardan insanlara geçtiği, insan ve hayvan enterokok suşları arasında direnç gen transferleri olduğu ve

dirençli enterokok suşlarının çiftlikte çalışan insanlarda da kolonize olduğu bildirilmiştir (46).

Virjinamisin yem katkı maddesi olarak kullanılmamasına rağmen, hala direnç görülmesi, broylerlerin kesime gönderildiği rotasyonlar arasında, kümeslerin temizlenmesine ve infeksiyonlardan arındırılmasına rağmen, dirençli bakteri klonlarının hala yaşamlarını devam ettirebilmesi nedeniyle kümeslere ard arda gelen broyler sürüleri arasında dirençli enterokokların transfer olduğu şeklinde açıklanmıştır (17).

E. faecalis izolatlarının kinopristin/dalfopristin kombinasyonuna yüksek oranda direnç göstermesinin intrinsik dirençli olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (41). *E. faecalis* suşlarının kinopristin/dalfopristine Joseph ve ark. (21) % 97, Hayes ve ark. (14) % 96, Kizirgil ve Doğanay (23), % 47.4 oranında dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada broyler ve köy tavukları *E. faecalis* suşlarının kinopristin / dalfopristine % 90.4 ve % 53.8 oranında dirençli olduğu belirlendi. *E. faecalis* izolatlarının hemen hemen hepsinin bu antimikrobiyal kombinasyona dirençli olması nedeniyle bu çalışmada konfirmasyon amacıyla değerlendirmeye alınmıştır.

Enterokokların yüksek düzey klindamisin ve aminoglikozid, glikopeptid, beta laktam, eritromisin, tetrasiklin, florokinolon ve kloramfenikollere karşı sonradan kazandığı antibiyotik direncinin konjugatif ve nonkonjugatif plazmid ve transpozon üzerinde bulunan direnç kodlayan genlerden olduğu bildirilmiştir (37). Son ve ark. (42), çoklu antibiyotik direnç gösteren 19 *E. faecium* suşunun 4'ün de tekli plazmid bantları, 11'inde küçük ikili plazmid bantları bulunduğunu ve 4 suşta plazmid bantı tespit edilmediği bildirmişlerdir. Jackson ve ark. (20) eritromisin dirençli enterokok suşunda tekli plazmid bantları, Kolar ve ark. (25) vankomisin dirençli enterokok suşunda farklı büyüklükte ikili, üçlü ve dördü plazmid bantları olduğu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da elde edilen verilere göre antibiyotik dirençli 50 enterokok suşunun 22 (% 44)'sinde sekiz farklı büyüklükte plazmid belirlendi ve bunların 9 plazmid paternine ayrıldıkları görüldü. Tekli veya çoklu antibiyotik dirençli enterokok izolatlarında plazmid görülmesi, antibiyotik direnci ile plazmidler arasında bağlantı olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışmadaki enterokok suşunun % 56'sında plazmid saptanamadı. Radu ve ark. (37), tavuk orijinli kaynaklardan izole edilen enterokok suşunun % 45.8'inde plazmid bantları tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (37), enterokok suşlarının yarısından azında plazmid bantlarının bulunamamasına karşın bu suşların çoklu antibiyotik direnç oranlarının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Plazmid içeren ve içermeyen antibiyotik (vankomisin) dirençli enterokok suşlarının, virülens faktörlerini ve antibiyotik direnç özelliklerini etkili gen transfer mekanizmaları ile aktarabilmesi nedeniyle bu bakterilerin önemli risk taşıdıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Ankara ve Kırıkale illerinde bulunan broylerlerin çoklu antibiyotik dirençli enterokok yönünden önemli bir rezervuar olduğu belirlendi. Broylerlerden izole edilen dirençli enterokok suşlarında farklı büyüklüklerde plazmid profilleri olduğu ortaya konuldu. Enterokok plazmidlerinin antibiyotik direnç genlerini konjugasyon yoluyla insanlar için patojen olan bakterilere transfer etmesi önemli bir risk olarak değerlendirildi. Enterokokların sahip oldukları antibiyotik dirençliliğini kontamine tavuk gıdaları aracılığı ile insanlara aktarabileceği düşünüldü.

Broyler işletmelerinde antibiyotiklere karşı direncin oluşması ve bakterilerdeki çoğul dirençliliğin engellenmesi için, ülke genelinde çok merkezli epidemiyolojik çalışmalar yapılarak patojen ve kommensal bakterilerdeki antibiyotik direnç durumunun ve gelişen direncin moleküler kökeninin sürekli takip edilmesi gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar Veteriner ve Tıp hekimliği ile paralel olarak değerlendirilmeli ve ulusal antimikrobiyal kullanım stratejileri geliştirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., Bager F. (2001) Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 2054-2059.
2. Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., Aarestrup, F.M. (1997) Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. Prevent. Vet. Med., 31: 95- 112.
3. Başustaoğlu, A. (2004) Hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç gelişimindeki rolü. Hastane İnfek. Derg., 8: 286- 291.
4. Berzeg, D. (2005) Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci ve E test ile vankomisin Mik değerlerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul Sağlık Müdürlüğü.
5. Butaye, P., Devriese, A., Haesebrouck, F. (2003) Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram positive bacteria. Clin. Microbiol. Rev., 2: 175-188.
6. Chingwaru, W., Mpuchane, S.F., Gashe, B.A. (2003) *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from milk, beef, and chickens and their antibiotic resistance. J. Food Protect., 66: 931-936.
7. Clinical Laboratory Standarts Institute (2003). M2-A8 Antimikrobik Disk Diffüzyon Testleri İçin Uygulama Standartları. 8. Baskı.
8. Çelik, S. (2001) Hayvan kökenli enterokok suşlarının virülens faktörleri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
9. Devriese, L.A., Homme, J., Wijnels, R., Haesebrouck, F. (1991) Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora poultry. J. Appl. Bacteriol., 71: 46-50.
10. Emborg, H.D., Andersen, H.J., Seyfarth, A.M., Wegener, H.C. (2003) Relations between the consumptions of antimicrobial growth promoters and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* isolated from broiler. Epidemiol. Infect., 132: 95-105.
11. Facklam, R.R., Collins, M.D. (1989) Identification of enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J. Clin. Microbiol., 27: 731-734.
12. Facklam, R.R., Sahm, D.F., Teixeria, L.M. (1999) *Enterococcus* 297- 304. In: Murray, P.R., Baran, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (Eds): Manual of Clinical Microbiology . 7 th Edition, Washington.
13. Harwood, V.J., Brownell, M., Perusek, W., Whitlock, J.E. (2001). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chickens feces in the United States. Appl. Environ. Microbiol., 67: 4930- 4933.
14. Hayes, J.R., English, L., Carr, L., Wagner, D., Joseph, S. (2004) Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. Appl. Environ. Microbiol., 70: 6005- 6011.

15. **Hersberger, E., Donabedian, S., Konstantinou, K., Zervos, M. (2004)** *Quinupristin-Dalfopristin resistance in gram positive bacteria: Mechanism of resistance and epidemiology.* Clin. Infect. Dis., 38: 92- 98.
16. **Hersberger, E., Opera, S.F., Donabedian, S., Peri, M., Bozigar, P., Bartlett, P., Zervos, M. (2005)** *Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin.* J. Antimicrob. Chemother., 55: 127- 130.
17. **Heuer, O.E., Pedersen, K., Jensen, L.B., Madsen, M., Olsen, J.E. (2002)** *Persistence of Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban.* Microbiol. Drug. Res., 8 (4): 355-361.
18. **Hirsh, D.C., Biberstein, E.L. (2004)** *Streptococcus and Enterococcus.* 159-169. In: Hirsh, D.C., Maclachlan, N.J., Walker, R.L. (Eds): Veterinary Microbiology. 2. ed. Blackwell Publishine Ltd., Ames, Iowa, USA.
19. **Ike, Y., Tanimoto, K., Ozawa, Y., Nomura, T., Fujimoto, S., Tomita, H. (1999)** *Vancomycin resistant enterococci in imported chickens in Japan.* Lancet, 353: 1854.
20. **Jackson, C.R., Cray, P., Baret, J., Ladely, S. (2004)** *Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses.* Avian Dis., 48 (1): 100-107.
21. **Joseph, S.W., Hayes, J.R., English, L.L., Carr, L.E., Wagner, D.D. (2001)** *Implication of multiple antimicrobial resistant enterococci, associated with the poultry environment.* Food Add. Contamin., 12: 1118-1123.
22. **Kaya, S., Çetin, E.S., Arıkan, S., Tetik, T., Kesbiç, H., Yaşar, S. (2007)** *Tavuklardan izole edilen E.coli, klebsiella ve enterokoklarda antibiotik duyarlılık durumları.* S.D.Ü. Tıp Fak. Derg., 14 (2): 24-27.
23. **Kizirgil, A., Doğanay, V. (2007)** *Kinopristin/ Dalfopristin ve diğer sekiz antimikrobiyal ajanın gram pozitif koklar üzerine in vitro etkinliği.* F.Ü. Sağ. Bil. Derg., 21 (3): 129-132.
24. **Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J. (2004)** *Enterococcal Infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities.* Vaccine, 22: 822- 830.
25. **Kolar, M., Pantucek, R., Bardon, J., Vagnerova, J., Typovska, H., Vakla, I., Doskar, J. (2002)** *Occurrence of antibiotic resistant bacterial strains isolated in poultry.* Vet. Med., 47: 52-59.
26. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. (1997)** *The Gram Positive Cocci, Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria.* 577-629. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed., Philadelphia. Lippincott.
27. **Lauderdale, T.L., Shiau, Y.R., Wang, H.Y., Lai, J.F., Huang, I.W., Chen, P.C., Chen, H.Y., Lai, S.S., Liu, Y.F., Ho, M. (2007)** *Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan.* Environ. Microbiol., 9 (3): 819-23.
28. **Leclerg, R., Courvalin, P. (1996)** *Emerging problems with enterococcal infections.* Cur. Opin. Infect. Dis., 9: 115- 119.
29. **Leme, I.L., Piantino, A.J., Bottino, J.A., Pignatari, A.C. (2000)** *Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in Sao Paulo, Brazil.* Braz. J. Microbiol., 31: 53-57.
30. **Lukasova, J., Sustackova, A. (2003)** *Enterococci and antibiotic resistance.* Acta Vet. Brno., 72: 315- 323.
31. **Manson, J.M., Smith, J.M.B., Cook, G.M. (2004)** *Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use.* Appl. Environ. Microbiol., 70: 5764-5768.
32. **Martin, B.S., Campos, L., Bravo, V., Adasne, M., Borie, C. (2005)** *Evaluation of antimicrobial resistance using indicator bacteria isolated from pigs and poultry in Chile.* Int. J. Appl. Res. Vet. Med., 3: 171- 178.
33. **Migura, L.G., Pleydell, E., Barnes, S., Davies, R.H., Liebana, E. (2005)** *Characterization of vancomycin resistant Enterococcus faecium isolates from broiler poultry and pig farms in England and Wales.* J. Clin. Microbiol., 43: 3283- 3289.
34. **Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., Torres, C. (2006)** *Antimicrobial resistance and the mechanism implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal.* Int. J. Antimicrob. Agent., 27: 131- 137.
35. **Quednau, M., Ahrne, S., Molin, P.G. (1998)** *Antibiotic resistant strains of enterococcus isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork.* J. Appl. Microbiol., 84: 1163- 1170.
36. **Quinn, P.J., Carter, M.E., Mackey, B., Cater G.R. (2000)** *The Streptococci and Related Cocci.* 127-136. In: Quinn, P.J., Carter, M.E., Mackey, B., Cater G.R. (Eds): Clinical Veterinary Microbiology, 6 th Ed., Mosby, Virginia, USA.
37. **Radu, S., Tosa, H., Rahim, R., Reezal, A., Ahmad, M., Hamid, A., Rusul, G., Nishibuchi, M. (2001)** *Occurrence of the vanA and vanC₂ /vanC₃ genes in enterococcus species isolated from poultry sources in Malaysia.* Diag. Microbiol. Infect. Dis., 39: 145-153.
38. **Rodrigues, J., Poeta, P., Martin, S.A., Costa, M.D. (2002)** *The importance of pets as reservoirs of resistant enterococcus strains with special reference to vancomycin.* J. Vet. Med., 49: 278- 280.

39. **Saccozza Erdenizmenli, M.** (2007) *Vankomisine dirençli enterokokların dünyada ve Türkiye’de epidemiyolojisi*. Erişim Adresi: <http://www.klimik.org.tr/FileUpload/yXvnlU3wDChh.pdf>. Erişim Tarihi: 24.10.2007.
40. **Shuford, J.A., Patel, R.** (2005) *Antimicrobial growth promoter use in live- implications for human health*. Rev. Med. Microbiol., 16: 17- 24.
41. **Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E.** (2002) *An Enterococcus faecalis ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin*. Antimicrob. Agents Chemother., 46: 1845–1850.
42. **Son, R., Nimita, F., Rusul, G., Nasreldin, E., Samuel, L., Nishibuchi, M.** (1999) *Isolation and molecular characterization of vancomycin resistant Enterococcus faecium in Malaysia*. Lett. Appl. Microbiol., 29: 118- 122.
43. **Şener, K., Saraçlı, M.A., Açikel, C.H., Doğançlı, L.** (2004) *Nozokomiyal metisiline dirençli Staphylococcus aureus izolatlarının genotiplendirilmesinde üç ayrı yöntemin incelenmesi*. Mikrobiyol. Bül., 38 (4): 363- 375.
44. **Tejedor-Junco, M.T., Afonso-Rodriquez, O., Martin-Barrasa, J.L., Gonzalez-Martin, M.** (2005) *Antimicrobial susceptibility of enterococcus strains isolated from poultry faeces*. Res. Vet. Sci., 78 (1): 33-38.
45. **Van Den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E.** (2000) *Epidemiology of resistance to antibiotics-links between animals and humans*. Int. J. Antimicrob. Agents, 14: 327- 355.
46. **Van Den Bogaard, A.E., Willems, R., London, N., Top, J., Stobberingh, E.E.** (2002) *Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers*. J. Antimicrob. Chemother., 49: 497- 505.
47. **Wegener, H.C.** (2003) *Antibiotics in animal feed and their role in resistance development*. Curr. Opin. Microbiol., 6: 439-445.
48. **Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, F.** (1999) *Use of antimicrobial growth promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe*. Emerg. Infect. Dis., 5: 329- 335.
49. **Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S.** (1998) *Isolation of glycopeptide-resistant enterococci from chickens in Japan*. Antimicrob. Agents Chemother., 42: 3333.

Yazışma Adresi:

Dr. Zahide DİLİK

Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü

Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Bölümü

35010-Bornova, İZMİR

E-mail: z_dilik@hotmail.com

OLGU RAPORU / CASE REPORT

ARILARDA BİR KARBAMAT PESTİSİD OLAN KARBARİLİN SEBEP OLDUĞU ZEHİRLENME OLGUSU

A POISONING CASE CAUSED BY CARBARYL, A CARBAMATE PESTICIDE, IN BEES

Yasemin COŐKUN¹ Ahmet Turan ERDOĐDU² Murat YABANLI³ Bilal ÖZ²

Geliş Tarihi (Received): 09.11.2009

Kabul Tarihi (Accepted): 20.10.2010

ÖZET

Bu alışma, Aydın ili Kuşadası ilçesi Davutlar beldesi ve Söke ilçesi AĞaçlı köyünde görülen yoğun arı ölümlerinin sebebini ortaya koymak amacıyla yapıldı. Ölen arılarda yapılan analizlerde karbamat pestisidlerden karbaril bulundu. Dokuz ayrı yetiştiriciden alınan numunelerde 44.20 - 277.85 ppb arasında karbaril tespit edildi. Ortalama karbaril düzeyi 128.90 ppb olarak hesaplandı. Yapılan analizler sonucunda arılarda belirlenen karbaril düzeyinin çok yüksek olduğu ve ölüm olaylarının karbarilden ileri gelmiş olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Arı, karbaril, zehirlenme.

SUMMARY

The aim of this study was to find the cause of the bee deaths resulting in Aydın villages. Carbaryl, a carbamate insecticide, was found at the analysis of dead bees. Carbaryl with a level of 44.20-277.85 ppb was detected at the samples taken from nine beekeepers. Average carbaryl level was calculated as 128.90 ppb. It was concluded that the levels of carbaryl in bees samples were extremely high and these results definitely suggested a poisoning caused by carbaryl.

Key words: Bee, carbaryl, poisoning.

GİRİŞ

Modern tarım tekniklerinin kullanıldığı lkelerde, tarım rnlerinin üretiminde nitel ve nicel olarak elde edilen başarılar makinalaşma, sulama vs. yanında, büyük ölçüde, zirai mücadele amacıyla kullanılan pestisidler ve yapay gübre uygulanmasından kaynaklanmaktadır (5). Hemen hemen bütün dünyada tarım zararlılarından kaynaklanan ürün kaybı çok önemli boyutlara ulaşmaktadır. Bitkisel gıda üretimini sürekli olumsuz yönde etkileyen bu durum, dünyanın yüzyüze bulunduğu açlık tehlikesinin daha da büyümesine neden olmaktadır (11).

Tarım zararlılarına karşı ilaç kullanımı sayesinde tarımsal ürünlerde zararlar en aza indirile-

bilmektedir. Bu durum kendisini üretim artışı ve ürün kalitesinde iyileşme olarak yansıtır. Kapalı ve açık alan ilaçlaması ile insan ve hayvanları rahatsız eden ve hastalıkların taşınmasına aracılık eden böcek ve diğer zararlılarla etkin bir şekilde mücadele sağlanabilir. Böylece rn artışı ve uzun süreyle saklanabilmeleri yanında, insanların yaşam kalitesi yükselmiş ve zararlılar tarafından aracılık edilen hastalıkların kontrolü ve söndürülmesinde başarı sağlanmıştır (6).

Pestisidler, kullanılma ve hazırlanma seçeneklerinin gereği olarak tümüyle etkin bir şekilde doğrudan vreye, su sistemlerine, doğal bitki örtüsüne, kültür bitkilerine, hayvanların üzerine ve barmaklarına uygulanırlar. Kullanılma amaçlarının

¹ Dr. Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR.

² Veteriner Hekim, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR.

³ Dr. Biyolog, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İZMİR.

bir gereği olmasa da, vahşi yaşam da dahil, insan ve hayvanlar için, bireysel ve toplu halde, akut, subakut ve kronik nitelikli zehirlenmeler ile mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etki tehlikesi taşırlar. Ayrıca geniş boyutlu çevre ve besin kirlenmesine yol açabilirler. Pestisidlerin çevredeki kalıcılıkları ve kirlilik düzeyleri ile canlılara yansıyan miktarları ve canlıların duyarlılıklarına göre çevre ve canlıların yaşamında yol açabilecekleri değişiklikler konusunda, eldeki bilgiler ışığında ileriye dönük öngörüler yapılabilmektedir (6).

Pestisidler ile zehirlenme bakımından hayvan populasyonları daha büyük bir riskle karşı karşıyadırlar. Çünkü açık ve kapalı ortamlarda yapılan pestisid uygulamaları, hayvanları doğrudan etkiler. Çevrede yem ve su kaynaklarında ortaya çıkan pestisid kirlilikleri öncelikle hayvanlara yansır. Taşıma, depolama ve uygulama aşamalarında hayvan yemleri, açık alanlar, çiftlik malzemeleri ve hayvan barınakları daha çok kirlenirler (11).

Evcil hayvanlarda pestisidler ile zehirlenmeleri daha da kolaylaştıran önemli tür ayrımları da söz konusudur. Bazı türler, farklı pestisid çeşitlerine karşı beklenmedik derecede duyarlı olabilir. Kanatlı hayvanlar ve bal arıları, sinek ve sivrisineklerle mücadele için uygulanan organik fosforlu ve karbamat grubu insektisidlerden kolayca etkilenerek kitleler halinde ölebilirler. Bu hayvanlar normal dozlardaki pestisid uygulamalarıyla bile kolayca zehirlenebilirler (8).

Arı zehirlenmelerinde arıların kullandığı iki önemli besin kaynağı rol oynamaktadır. Bunlardan birincisi bitkiler diğeri de sudur. Dolayısıyla bu iki besin maddesinde bulunan zehirler zehirlenme nedenini oluşturmaktadır. Arıların bitki özlerini toplamak için kovanlarının bulunduğu yerden uzak yerlere uçmaları, tarım zararlılarına karşı kullanılan pestisidlere maruz kalmalarına neden olabilmektedir. Ayrıca kasıt amacıyla çeşitli zehirlerin arı kovanlarının yanına, arıların kullandıkları su ve bitkilere bırakılması zehirlenme nedenlerini oluşturur (2). Zirai mücadele ilaçlarının cinsi, uygulama yeri ve zamanı, dekara uygulanan miktarı, bitkiler üzerindeki kalıcılığı, ilaçlamanın yapıldığı günlerdeki meteorolojik koşullar, kullanılan ilaçların arılara olan etkisi üzerinde rol oynamaktadır (1).

Ülkemiz arı yetiştiriciliği açısından büyük bir potansiyele sahiptir. T.C. Başbakanlık Türkiye

İstatistik Kurumu verilerine göre 2008 yılında 4 888 961 kovandan 81 364 ton bal üretimi olmuştur (12). Bal verimi ve bal ihracatının artması için, arı hastalıkları ile mücadelenin yanısıra zehirlenmelere de dikkat edilmesi gerekir (2).

Karbamat pestisidler karbamik asit esterleridirler. Genel yapısal formüllerinde bulunan kimyasal gruplara göre zirai mücadele ve veteriner hekimlikte insektisid, herbisid, fungusid ve nematosid amaçlarla kullanılırlar (5). Karbamat insektisidler deri, mukozalar, akciğerler ve sindirim kanalından emilerek vücuda girdikten sonra asetilkolin esterazın etkinliğini engelleyerek nöro-efektör yapılarda ve sinapslarda asetilkolin birikimine bağlı olarak zehirlenmeye neden olurlar (6).

Karbaril temas ve mide zehiri olarak etkir. Sistemik etkisi zayıftır. Memeliler için orta derecede zehirli olan karbaril, arılar ve sucul omurgasızlar için çok zehirli, balıklar için orta düzeyde zehirlidir. Köpek ve tavuk embriyoları için teratojenik etkisi vardır. Karbarilin arılar için temas yoluyla öldürücü doz 50 miktarı (ÖD50): 1µg/arı'dır (6, 10, 13).

Bu çalışmada Aydın ili Kuşadası ilçesi Davutlar beldesi ve Söke ilçesi Ağaçalı köyünde karbamat grubu pestisidlerden karbaril etkin maddeli zirai mücadele ilacının sebep olduğu yoğun arı ölümlerine ilgili bir zehirlenme olgusu bildirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada materyal olarak Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü uzmanları ve Aydın ili Tarım İl Müdürlüğü personeli tarafından 9 kovan sahibinden alınan ölü arılar numune olarak kullanıldı. Otuz beş kovan sahibine ait 5076 kovanda ortalama % 63 oranında hasar tespit edildi. Çalışmada 9 kovan sahibinin her birinden 25 gram ölü arı alınarak numune olarak kullanıldı.

Numunelerden pestisidlerin özütlenmesi asetonitrille gerçekleştirildi. Asetonitril özüt tuzlu su ile karıştırılarak ortamdan pestisidler sıvı-sıvı faz ayrımı yapılarak önce n-hekzana, sonra kloroforma alındı. Kloroform ve n-hekzan karışımı evaporatörde uçuruldu. Özüt metanol ile çözüldü. Organik klorlu ve organik fosforlu pestisid kalıntıları, Gaz Kromatografi Kütle Spektrometre (GC-

MS), karbamat grubu pestisid kalıntıları, Likit Kromatografi Sıralı Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) cihazında standartlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Numunelerden pestisidlerin özütlenmesi Mills (7) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. Özütteki pestisid kalıntılarının belirlenmesi gaz kromatografi kütle spektrometre cihazı ile Pelosi ve ark. (9)'na göre, likit kromatografi sıralı kütle spektrometre cihazı ile ise laboratuvar tarafından geliştirilen metoda göre gerçekleştirildi. Sonuçlar ppb olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Arı numuneleri, bakteriyolojik, parazitolojik ve toksikolojik yönden analiz edildi. Bakteriyolojik ve parazitolojik muayenelerde herhangi bir etkene rastlanmadı. Toksikolojik olarak organik klorlu, organik fosforlu ve karbamat grubu pestisidler yönünden analiz edildi. Yapılan analizler sonucunda 9 kovan sahibinden alınan arı örneklerinde karbamat grubu pestisidlerden karbaril bulundu (Tablo 1).

En yüksek karbaril düzeyi 277.85 ppb ile 9 numaralı arıdan alınan arı numunelerinde, en düşük karbaril düzeyi ise 44.20 ppb ile 4 numaralı arıdan alınan arı numunelerinde tespit edildi (Tablo 1).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada ilk kitlesel arı ölümlerinin 1959 yılında Washington eyaletinde elma, armut ve şeftalilere püskürtme yoluyla sıkılan karbarilden

meydana geldiği bildirilmiştir. Yakima Vadisi'nde Ağustos 1960'da karbaril tozu nedeniyle daha büyük bir koloni yıkımı gerçekleşmiştir. Mısır solucanının (*Heliothis zea*) kontrolü için kullanılan karbaril tozunun toplayıcı arılar tarafından kolonilere hızla taşındığı tespit edilmiştir. Bulaşık polen ile beslenen larvalar ve genç erişkinler ölmüştür. Büyük zarar gören kolonilerin % 25'i tamamen ölmüş, % 50'si kraliçelerini kaybetmiş, % 25'inin anormal kraliçe aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Arıcılar, bir sonraki baharda da bulaşık mısır poleni tüketen arılarda azalma ve sonuçta ölüm gözlemlemişlerdir (4).

Karbaril, temas ederek veya çiçek açan bitkilerden ilacı alan arılar için çok zehirli bir madde dir. Arılar birçok ağaç ve meyvenin polenlenmesi için gereklidir. Arılarda görülen zehirlenme olaylarının çoğu çiçek açma döneminde tahıllara uygulanan pestisidlerden meydana gelir. Pestisid uygulayıcıları bal arılarını korumak için pestisid müstahzarlarını formül belgelerine uygun kullanmalı, uzun süre kalıntı tehlikesi olan pestisidler çiçek açan tahıllara uygulanmamalı, diğer haşere kontrol yöntemleri ile uyumlu olduğu sürece arılar için daha az zararlı olan pestisidler kullanılmalı, uygulama sırasında sıcaklıklar alışılmadık şekilde düşük olduğu takdirde pestisidler uygulanmamalı zira bu durumda pestisidlerin kalıcılığı en az iki kat artmaktadır, arılar için kısa süre kalıntı tehlikesi oluşturan pestisidler arıların aktif olarak yiyecek aramadığı akşamın geç saatleri ile sabahın erken saatlerinde uygulanmalı, arıların uçuş alanı içerisindeki su kaynakları pestisidlerle kirletilmemeli,

Tablo 1. Numunelerde Tespit Edilen Pestisidler ve Miktarları.

Materyal	Numunenin Alındığı Yerleşim Yeri ve Temsil Ettiği Kovan Sayısı	Tespit Edilen Etkin Madde	Miktar ppb
Arı - 1	Davutlar-Kuşadası / 130	Karbaril	100.80
Arı - 2	Ağaçlı - Söke / 115	Karbaril	86.75
Arı - 3	Ağaçlı - Söke / 200	Karbaril	97.73
Arı - 4	Ağaçlı - Söke / 121	Karbaril	44.20
Arı - 5	Ağaçlı - Söke / 110	Karbaril	99.30
Arı - 6	Ağaçlı - Söke / 320	Karbaril	182.88
Arı - 7	Ağaçlı - Söke / 250	Karbaril	90.43
Arı - 8	Davutlar - Kuşadası / 120	Karbaril	180.12
Arı - 9	Ağaçlı - Söke / 155	Karbaril	277.85

arı yetiştiricilerine kovanlarını pestisid uygulayacak bölgeden taşınmaları için en az 48 saat süre verilmeli, pestisid uygulaması planlanan bölgelerde kovanlar için uyarı olsun veya olmasın dikkatli olunmalıdır (3, 10).

Arı yetiştiricileri, arıları zehirlenmelere karşı korumak için meyve ağaçları ve tarlaların yakınılarında sahibinin adı, adresi ve telefon numarası olmayan arı kolonilerini bırakmamalıdır. Ayrıca ölümlerin % 50-90'ı uygulamadan sonraki ilk 24 saat içerisinde olduğundan, pestisit uygulanan alanlara uygulamadan en az 48-72 saat sonrasında kadar kovan bırakmamalıdır (10).

Aydın ili Kuşadası ilçesi Davutlar beldesi ve Söke ilçesi Ağaçlı köylerinden alınan arılarda, arılar için çok zehirli olan ve yüksek düzeylerde karbaril belirlenmesi görülen yoğun arı ölümlerinin anılan maddeden ileri geldiğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. **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.
2. **Doğan, A., Topçu, B., Bilgili, A.** (1999) *Arılarda organik fosforlu insektisid (kaumafos) zehirlenmesi*. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 5 (2):125-127.
3. **Pirsa (Primary Industries and Resources SA) Biosecurity-Rural Chemicals and Limestone Coast ChemCare Committee** (2010) *Reducing harm to honey bees from pesticides*. FS02/07. Erişim: http://www.pir.sa.gov.au/_data/assets/pdf_file/0006/126294/Bee_Fact_Sheet_Feb_2010.pdf. Erişim tarihi: 02.09.2010.
4. **Johansen, C.A., Brown, F.C.** (1972) *Toxicity of carbaryl-contaminated pollen collected by honey bees*. Environ. Entomol., 1 (3): 385-386.
5. **Kaya, S.** (1985) *Sığır ve koyunlarda bir karbamat pestisid olan aldikarbın sebep olduğu bir toplu zehirlenme olayı*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 32 (3): 423-428.
6. **Kaya, S.** (1998) *Pestisidler*. Alınmıştır: Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. (Editörler): Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayınevi, Ankara.
7. **Mills, P.A.** (1959) *Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography*. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 42: 734-740.
8. **Ontario Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs** (2010) *Pollination and bee poisoning prevention*. Erişim: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/food/inspection/bees/pollination.htm>. Erişim tarihi: 28.06.2010.
9. **Pelosi, P., Stefanelli, P., Attard Barbini, D., Generali, T., Amendola, G., Girolimetti, S., Vanni, F., Di Muccio, A.** (2002) *Methods for organochlorine, organophosphorus, pyrethroid and carbamate pesticide residues in foods of animal origin*. The Italian National Reference Laboratory (Pesticide Residues Section of the ISS-Istituto Superiore di Sanita (National Institute of Health)-Roma.
10. **Riedl, H., Johansen, E., Brever, L., Barbour, J.** (2006) *How to reduce bee poisoning from pesticide. A Pacific Northwest Extension publication*. PNW 591. Oregon State University, Corvallis. Erişim: <http://extension.oregonstate.edu/catalog/pdf/pnw/pnw591.pdf>. Erişim tarihi: 28.06.2010.
11. **Şanlı, Y.** (1994) *Türkiye'de pestisid kullanımından kaynaklanan çevre ve besin kirlenmesi sorunları*. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim 13-14, Ankara, Türkiye.
12. **Türkiye İstatistik Kurumu** (2009) *Hayvansal üretim 2008*. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Erişim: http://www.tuik.gov.tr/tarim/hayvancilik_istatistikleri. Erişim tarihi: 22.10.2009.
13. **US EPA (United State Environmental Protection Agency)** (2004) *Carbaryl Ired (Interim Reregistration Eligibility Decision) Facts*. [Revised 10/22/04]. Office of Pesticide Programs. Erişim: http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDS/carbaryl_ired.pdf. Erişim tarihi: 02.11.2009.

Yazışma Adresi:

Dr. Yasemin COŞKUN
Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,
Toksikoloji Bölümü.
35010 Bornova / İZMİR
E-mail: yasemincoskun71@gmail.com

DERLEME / REVIEW

BAKTERİYEL GLİKOPROTEİNLER*

BACTERIAL GLYCOPROTEINS

Erdem ÇİÇEK¹

Şükrü KIRKAN²

Geliş Tarihi (Received): 24.08.2010

Kabul Tarihi (Accepted): 31.10.2010

ÖZET

Glikozilasyon, sakkaritlerin enzimler aracılığıyla birbirine bağlanarak, proteinlere, lipitlere veya organik moleküllere bağlı glikanlar oluşturma sürecidir. Glikozilasyon sonucu oluşan glikoproteinler, bir protein ve karbonhidrattan oluşan heteroproteinleri ifade eder. Önceleri glikozilasyon sadece ökaryotlar tarafından sergilenen bir fenomen olarak düşünölmekteydi. Bunun başlıca sebebi prokaryotların kısa yaşamları ve ökaryotik glikoprotein biyosentezinde gerekli olan hücre organellerinin prokaryotlardaki eksikliği olarak belirtilmekteydi. Günümüzde, birçok gözlemden prokaryotik glikoproteinlerin, yüksek organizmalarda bulunan glikoproteinler kadar yaygın olduğu anlaşılmaktadır. Bu glikanların biyolojik rolleri; ökaryotiklere benzer olarak kendisini sentezleyen organizmanın gelişimi, büyümesi, fonksiyonları ve yaşaması için kritik olan geniş bir spektrumu içermektedir. Bu derlemede bakteriyel glikoproteinlerin sentezi, fonksiyonları ve endüstriyel potansiyelleri ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Bakteri, biyosentez, glikoprotein, prokaryot.

SUMMARY

Glycosylation is the enzymatic process that links saccharides to produce glycans, attached to proteins, lipids or other organic molecules. Glycoproteins occur due to glycosylation and they described as heteroproteins that consist of a protein and carbohydrate. Previously, glycosylation was thought to be a phenomenon exhibited exclusively by eukaryotes and not prokaryotes, mainly because of the short life span of prokaryotes and the lack, in prokaryotes, of the cellular organelles shown to be required in eukaryotic glycoprotein biosynthesis. Today we can assume from different observations that prokaryotic glycoproteins may well be as common as glycoproteins in higher organisms and the biological roles of glycans like eukaryotes span the spectrum from those that appear to be relatively subtle, to those that are crucial for the development, growth, functioning, or survival of the organism that synthesizes them. This review summarizes the synthesis, functional roles and the industrial potential of bacterial glycoproteins.

Key words: Bacteria, biosynthesis, glycoprotein, prokaryote.

GİRİŞ

Moleküler biyolojide glikanların ve genellikle diğer makro moleküller ile kovalent kombinasyonları olan glikokonjugatların önemi büyüktür. Glikokonjugat bir ya da daha fazla monosakkarit ya da oligosakkarit birimlerinin (Glikon) nonkarbonhidrat bir gruba (Aglikon) kovalent bağlanması ile oluşan bileşiktir. Başka bir deyişle glikokonjugat

monosakkaritlerin protein ya da lipidlere kovalent bağlı olduğu makro molekülleri ifade eder. Glikokonjugatlar glikoprotein ve glikolipid olarak 2 gruba ayrılır (13).

Glikoprotein bir protein ve karbonhidrattan oluşan heteroproteinleri ifade eder. Ön ek *gliko-* ve son ekler *-sakkarit* ve *-glikan* bileşende karbonhidrat olduğunu belirtir (Örneğin *glikoproteinler*, *glikolipidler* ve *proteoglikanlar*). Doğal olarak oluşan glikokon-

* Derleme, 1. yazarın ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda hazırladığı 1. Doktora seminerinden özetlenmiştir.

¹ Uzm.Gıda Mühendisi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD, Aydın.

² Dç. Dr. ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Aydın.

jugatlarda, molekülün glikan içeren kısmı büyüklüğüne, minör veya dominant bileşen olmasına veya tek olmasına bağlı olarak değişiklik gösterir. Birçok olayda, glikan glikokonjugat kütesinin hemen hemen tamamını kapsar. Bu nedenle doğadaki tüm hücre tiplerinin yüzeyleri yoğun bir sıra halinde şekerlerle kaplanmıştır ve bu da glikokaliks olarak adlandırılan özel bir yapıyı oluşturur (2, 18).

Glikanların hücrede çok fazla bulunması ve kompleks yapısından dolayı, biyolojik rolleri değişiklik gösterir. Glikanların biyolojik rolleri organizmanın gelişimi, büyümesi, fonksiyonları ve yaşaması için kritik olan geniş bir spektrumu içerir. Glikanların rolleri basitçe 2 ana sınıfa ayrılabilir;

1. Yapısal ve modülatör fonksiyonlar (glikanın kendisini ve tutunduğu moleküldeki modülasyonları da içerir) ve
2. Glikanların glikan-bağlayan proteinler tarafından spesifik tanınmaları (4, 11).

Protein veya peptidlere bağlı olarak bulunan glikokonjugatlar, uzun süre prokaryotlarda olmadığı düşünülen ribozomal translasyonel mekanizma tarafından üretilirler. Glikokonjugat sentezini başlatan glikoziltransferazlar oligosakkarit, monosakkarit, polipeptid, lipid, küçük organik moleküller ve hatta DNA gibi akseptör substratlar kullanırlar. Genel söylemle, bu enzimler sırayla etki ederler, yani bir enzim ürünü diğerinin sonraki eylemi için akseptör substrat sağlar. En son ürün monosakkaritlerin birbirine bağlanarak oluşturduğu lineer ve/veya dallı polimerlerdir (5, 16).

Önceleri glikozilasyon sadece ökaryotlar tarafından sergilenen bir fenomen olarak düşünülüyordu. Bunun başlıca sebebi prokaryotların kısa yaşamları ve ökaryotik glikoprotein biyosentezinde gerekli olan hücre organellerinin prokaryotlardaki eksikliği olarak düşünülmekteydi. Bu yüzden prokaryotik glikoproteinlerin biyosentezinin ökaryotlardan farklı rota izleyebileceğine dair bir olasılık bulunmaktadır. Ancak oligosakkarit zincirlerinin toplanması için nükleotid-aktif şeker kalıntılarının kullanımı ve lipid-bağlı ara-ürünlerin bulunması gibi benzer reaksiyonlar, prokaryotik glikolizasyon işleminde de gözlemlenmektedir.

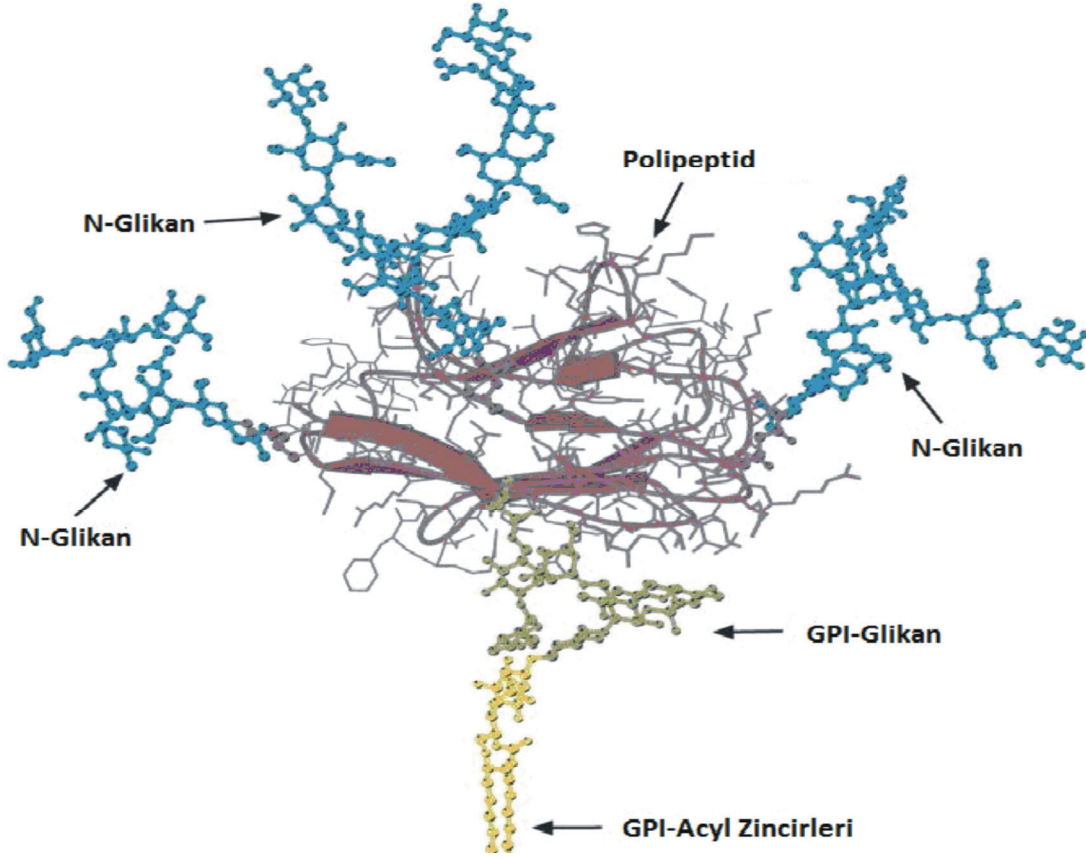
Diğer taraftan, nükleotid difosfat-bağlı oligosakkaritlerin oluşumu prokaryotik ve ökaryotik glikolizasyon mekanizmalarında farklılık göstermektedir (12, 17).

BAKTERİYEL GLİKOPROTEİNLERİN OLUŞUMU, KONUMU VE YAPISI

Ökaryotlarda, karbonhidrat ve protein-peptide katılan önemli ve karakteristik kovalent bağ(lar) 5 farklı tipte glikozidik bağ oluşturur; N-glikozidler, O-glikozidler, fosfor-bağlı glikozidler, S-glikozidler ve C-glikozidler. Bunlardan sadece N- ve O-glikolizasyon bakteriyel glikoproteinlerde rapor edilmiştir. *Eubacteria* O- veya N-glikana sahip olabilir, baskın tip O-glikozidik bağdır. *Archeobacteria*'de O- veya N-glikana ya da her ikisine de sahip olabilirken baskın tip N-glikozidik bağdır (17).

İki monosakkarit birimi bir glikozidik bağ ile bir araya gelebilirler. Bu tüm oligosakkaritlerde bulunan monosakkarit bloklar arası ana bağdır. Glikozidik bağ, bir monosakkaritin anomerik karbonu ile diğerinin hidroksil grubu arasında oluşur. Kimyasal terimler ile bir hemiasetal grubunun alkol grubu ile reaksiyona girerek asetal oluşmasıdır. Glikozidik bağlar, aslında metanol yada etanol gibi basit alkoller, serin (Ser), treonin (Thr), tirozin (Tyr) gibi hidroksi amino asitler de dahil herhangi bir hidroksi bileşik ile oluşturulabilir. Gerçekte, şekerler ve bu aminoasitler ile proteinler arasında oluşan glikozidik bağlar glikoproteinleri meydana getirir (2, 16).

N-glikanlar proteinlere asparajin birikimi üzerinden N-glikozidik bağ ile kovalent olarak bağlanır (Şekil 1). Rapor edilen 5 farklı N-glikan bağından en yaygını N-asetilglukozamin-asparajin (GlcNAc β 1-Asn) dir. N-glikanlar glikoproteinlerin konformasyonu, çözünürlüğü, antijenitesi ve glikan-bağlayıcı proteinler tarafından tanınması gibi pek çok özelliğini etkiler. N-glikanlar, hücre biyologları tarafından bir glikoproteini lokalize etmek veya hücreye doğru hareketini takip etmek için etiket olarak kullanılırlar. N-glikan sentezinde meydana gelen hatalar insanlarda pek çok hastalığa neden olmaktadır (15).



Şekil 1. Üç N-glikan(mavi) ve glikozilfosfadillinositol (GPI-glikan, yeşil) içeren Thy-1 glikoproteininin şematik görünümü (18).

Figure 1. Schematic representation of the Thy-1 glycoprotein including the three N-glycans (blue) and a glycosylphosphatidylinositol (GPI-glycan, green) (18).

O-glikozilasyon memeli glikoproteinlerinin serin ve treonin moleküllerinin ortak kovalent modifikasyonlarıdır. Glikoproteinler genelde musin olarak adlandırılır. Musinlerde, O-glikanlar *N*-asetilgalaktozamin (GalNAc) fonksiyonel grubu yolu ile serinin veya treoninin –OH yapısına O-glikozidik bağ ile kovalent olarak α -bağlanırlar ve bu yapılar musin O-glikan veya O-GalNAc glikanlar olarak adlandırılır. Birçok musin olmayan O-glikan tipleri de mevcuttur, bunlar α -bağlı O-fukoz, β -bağlı O-ksiloz, α -bağlı O-mannoz, β -bağlı O-GlcNAc (*N*-asetilglukozamin), α - veya β -bağlı O-galaktoz ve α - veya β -bağlı O-glukoz glikanlardır (7, 18).

Glikoprotein yapısının ökaryot ve prokaryotlarda aynı olması beklenir. Elde edilen verilere göre ise prokaryotik glikoprotein yapısının ökaryotlardakine göre çok farklı olduğu görülmektedir. Yine de bazı benzer karakteristikler bulunur.

Prokaryotik ve ökaryotik glikoproteinlerde şeker zincirleri protein yapısına ya Asn kalıntısının amid nitrojen yolu ile (N-glikozilasyon) ya da Ser veya Thr (bazen Tyr) nin hidroksil grupları yolu ile (O-glikozilasyon) bağlanırlar. Fakat bazı bakterilerde ayrı uzlaşma sekansları rapor edilmiştir. Örneğin *Chryseobacterium meningosepticum* da Asp-Ser ve Asp-Thr ve *Thermoanaerobacter kivui* de Val-Thr sekansları birbirinden farklıdır. Prokaryot ve ökaryotlarda protein birden fazla tip glikan taşıya veya bazı glikanlar tamamlanmamış ya da modifiye halde bulunsa da glikanlar heterojendir (17).

Rapor edilen bütün prokaryotik glikoproteinler lokalizasyonuna göre 5 ana tipte sınıflandırılabilir. Bunlar yüzey-tabaka (S-tabaka) glikoproteinler (bakteri hücre duvarının dış makromoleküler monokatmanında bulunan glikoprotein alt-birimleri), membran-ilişkili glikoproteinler (bakte-

rilerin dış/iç membranında ve periplazmik boşlukta bulunan glikoproteinler), hücre-yüzey glikoproteinler (pili ya da flagelli ile ilişkili alt birimler), salgı glikoproteinler, ekzo-enzimler ve hücreli glikoproteinler (hücredeki yeri belirsiz veya nonspesifik olanlar) olarak belirtilmektedir (17).

BAKTERİYEL GLİKOPROTEİNLERİN FONKSİYONLARI

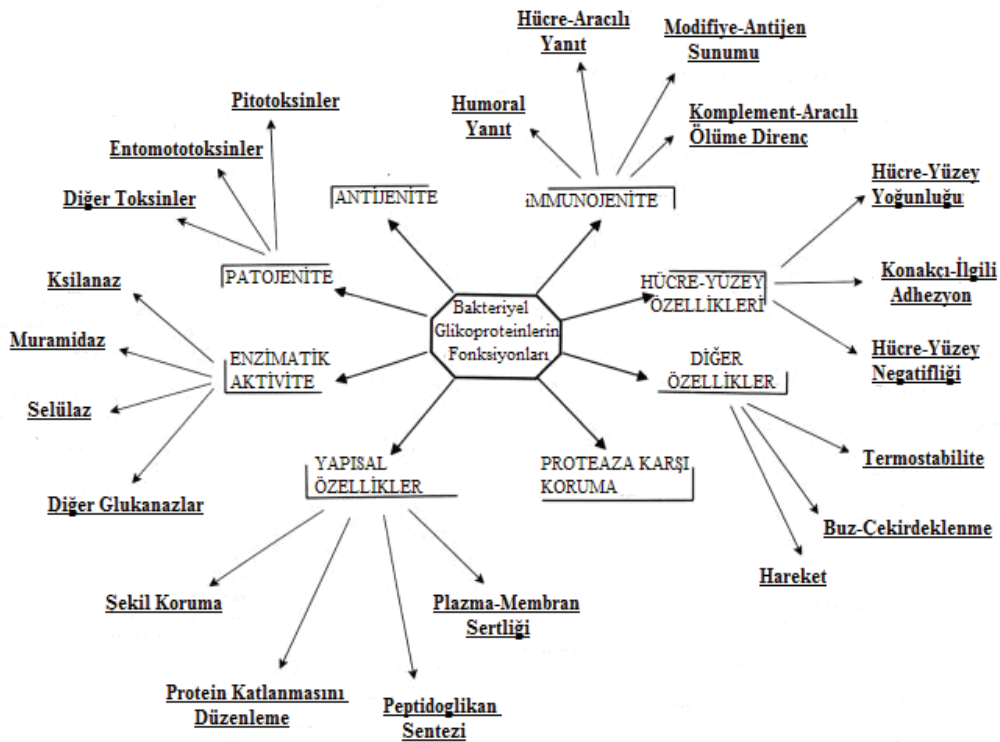
Glikozilasyonun protein fonksiyonlarında meydana getirdiği etki genellikle ökaryotik glikoproteinler üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Ökaryotik glikoproteinlerde fonksiyonel glikan grubunun önemli işlevleri:

- protein biçim ve stabilitesini muhafaza etme;
- yüzey ya da hücre içi tanınma ve hücre adhezyonu;
- çözünürlük, viskozite, yüzey elektriği gibi fizikokimyasal özelliklerin modülasyonu;
- biyolojik aktivitenin sağlanması;
- hücre içi ayırımı;

- glikoproteinin dışa açılması, embriyonik gelişim ve farklılaşma olarak belirtilebilir.

Glikanların biyolojik rolleri önemsiz aktivitelerden organizmanın gelişimi, fonksiyonları ve yaşamı için zorunlu olan aktivitelere kadar geniş bir spektrumu kapsar. Glikanlar farklı dokularda veya gelişimin farklı evrelerinde değişik roller üstlenebilirler. Terminal diziler, ender glikanlar ve modifikasyonların spesifik biyolojik rollere aracılık etmeleri daha olasıdır. Ancak, terminal diziler, ender glikanlar ve modifikasyonlar mikroorganizmalar ve zararlı ajanlar arasında evrimsel etkileşimleri de yansıtabilir. Sonuçta, spesifik bir glikanın fonksiyonunu veya organizma için önemini önceden belirlemek çok zordur (17, 18).

Prokaryotlarda glikozilasyonun önemi ve fonksiyonel rolü, eksik glikan mutantları ve doğal tip türlerin karşılaştırılması; deneysel koşulların rekabetçi şekerler var ve yok iken karşılaştırılması; kültür besiyerine besinlerin konulması veya çıkarılması ve rekombinant DNA teknolojisi ile analiz edilebilir (Şekil 2) (17).



Şekil 2. Bakteriyel glikoproteinlerin fonksiyonel rolleri (17).

Figure 2. Functional roles of bacterial glycoproteins (17).

Bakteri hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinler, bakteri ve ökaryotik hücre arasındaki hücre-hücre etkileşime katılırlar. Enzimler üzerindeki glikanların substratla etkileşimde yardımcı olabileceği düşünülebilir. Fakat meningokokal pili'den glikanın uzaklaştırılması, endotelial ya da epitelium hücrelerden adhezyonu etkilememektedir (6).

Pek çok çalışma glikolize proteinlerin konakçı organizma immünojenite ve patojenitesinde anahtar rol oynadığını doğrulamıştır (Tablo 1). Glikoproteinlerin virulans açısından ilgilendiğinde en dikkate değer patojenler, bakteri cinsindedir (*Treponema*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Neisseria* vs). *Campylobacter fetus* gibi organizmalar antifagositik bileşenler ürettikleri için bakteriye virulans kazandırır, diğerleri patojenez adhezyonu ve devamında invazyon gösterirler. Membran üzerine yada hücre yüzey yapılarına (pilus/flagella) lokalize olan glikoproteinler, genellikle bu adheziv fonksiyonlara katılırlar ve sonuç olarak konakçı ve bakteri arasında yakın temas sağlarlar. Aynı konakçı-ilişkili adhezyon ETEC *E.coli* TibA glikoproteininde de gözlemlenmiştir. *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*'in larvisidal glikoprotein toksini kovalent-bağlı amino şeker içerir, bunlar larval sivrisinek bağırsağındaki lektin reseptörleri ile tanınırlar ve sonuçta entomotoksik aktivitesini gösterirler (17).

BİYOSENTEZİ

Glikanların biyosentezi öncelikle monosakkarit gruplarını lineer ve dallanmış glikan zincirleri haline toplayan glikoziltransferaz tarafından belirlenir. Doğada bulunan glikan yapılarının kompleks sıralanmasından da anlaşılacağı üzere, glikozil transferazlar (GT'lar) çok fazla sayıda enzim içerirler. Ayrıca glikanları sentez ve metabolize etmek için glikozid hidrolazlar (GH'lar; glikozidaz olarak ta adlandırılırlar), nükleotid şeker taşıyıcılar ve diğer bazı enzimler gereklidir. Bu aktiviteleri kodlamak için genomda birçok gene ihtiyaç duyulmaktadır. Birincil gen ürünleri olan protein dizilerinden farklı olarak, glikan zincirleri genomda direkt kodlanmamışlardır ve ikincil gen ürünleridir. İnsan genlerinin çok azının glikan zincirlerinin biyosentezi ve toplanmasını sağlayan enzimlerden veya taşıyıcılardan sorumlu olduğu

bilinmektedir. Doğadaki proteinlerde gözlemlendiği gibi, glikanların hidroksil grupları sülfat, fosfat veya asetik esterle modifiye edilerek ek yapısal çeşitlilikler sağlanabilir. Glikan sentezinden önce monosakkaritler donör olarak kullanılarak nükleotid şekerlere veya lipid-bağlı şekerlere aktive edilirler. Lipid-bağlı şeker donörleri membrandan geçebilirken, nükleotid şekerlerin ER-Golgi lumenden transfer olmaları gerekmektedir. Glikan veya glikokonjugatın her bağlanma birimi ayrı bir veya birkaç glikoziltransferaz tarafından bir araya getirilmektedir. Birçok glikoziltransferaz akseptörlerinin altında bulunan glikanı tanımakla beraber bazıları lipid veya protein spesifik olabilirler (1, 3, 18).

Glikozil transferazlar hücre-yüzeyine lokalize olurlar, büyüyen oligosakkarit zincirinde; O- ve N-oligosakkarit sentezini katalize ederler. Bunu şeker kalıntısını, aktive edilmiş donör substrattan (bunlar ayrıca UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc vs. gibi nükleotid şeker türevleri, dolicofosforil glukoz gibi lipid-bağlı şekerler olabilir) akseptör substratın hidroksil grubuna doğru transfer ederek gerçekleştirirler. Bu enzimler transfer ettiği şeker tipine bağlı olarak sialyl transferaz, galaktosil transferaz, fukozil transferaz gibi birçok ailede sınıflandırılabilir. Bir bağ-bir enzim hipotezine göre, biyosentetik işlemler her glikozidik bağ için farklı bir enzim içerir (9).

BAKTERİYEL GLİKOPROTEİNLERİN ENDÜSTRİYEL POTANSİYELLERİ

Bakteriyel glikoproteinler içerisinde S-tabaka glikoproteinleri önemli bir yer kaplar. Birçok S-tabaka glikoprotein, hücreyi destekleyen zarf katmanlarında, iki boyutlu kristal dizilerini birleştirme özelliğine sahiptir ve buda glikan parçalarının bakteri hücrelerini tam anlamıyla sarmasını sağlar. Bu durum Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkaritler tarafından polisakkarit tabaka ile kaplanmasına benzetilebilir. Aminoasit yan zincirlerinin S-tabaka örgü fonksiyonel gruplarının periyodik yapısı, tanımlı ve düzenli olarak tekrarlanan pozisyon ve oryantasyonlarda dizilmektedir. Bu nedenle bunlardan, enzimlerin immobilizasyonunda matriks, antikor veya ligand ve kovalent bağlı makromolekül olarak faydalınabilir. Ek olarak, biyoanalitik mono ve multi-enzim sensörleri,

enzim ve afinite membran, immunoassay çubuklar ve afinite mikroparçalar gibi potansiyel uygulamalar için de kullanılabilirler (14, 17).

S-tabakası kaplı lipozomlar çeşitli hedef molekülleri yakalamak ve bağlamak için çok yönlü bir sistem olarak da kullanılabilir. S-tabaka alt birimleri (glikoproteinlerde dahil) lipozom yüze-

Tablo 1. Patojeniteden sorumlu bakteriyel glikoproteinler (17).

Table 1. Bacterial glycoproteins responsible for pathogenicity (17).

Organizma	Kategori	Glikoprotein	Konum	Mekanizma	Klinik sendromlar
<i>ETEC E. coli</i>	Entero toksijenik	Tib A (Adhesin Invasin)	OMPa)	TibA konakçı ve bakteri arasındaki etkileşime aracılık eder ve böylece konakçıyı istila eder.	İshal
<i>Campylobacter jejuni</i>	Enterotoksik	(Adhesin)	Flagella	Diğer adhesinlere benzer	Campylobacterioziz Akut kolit; Guillan-Barre sendromu
<i>Campylobacter fetus</i>	Entero patojenik	Antijen [a]	OMP	Hücreler bu antijene makrofajlara karşı direnç kazanmak için sahiptirler	Septisemi, spontane doğum diğer sistemik enfeksiyonlar
<i>Treponema pallidum</i>	Patojenik	Protein Antijenleri	OMP	Glikoproteinler konakçı hücre adezyonuna aracılık ederler	Frengi
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Patojenik	Gonokokal pili	Pili	Pilin terminal galaktoz ucu konakçı hücreye yapışmaya aracılık eder	Bel soğukluğu pelvik inflamatuvar hastalık (PID) Proktitis Artritis
<i>Neisseria meningitidis</i>	Patojenik	Pilin	Pili	Diğer adhesinlere benzer	Menenjit; Menengo koksemi, Waterhouse Friedrichson sendrom
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Patojenik	OspA OspB	OMP	Omurgalı ve omurgasız konakçılarda hücre yüzeyine yapışma	Lyme hastalığı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patojenik	Pilin	Pili	Diğer adhesinlere benzer	Sistit; bronşit,zatürre Endokardit. keratit
<i>Clostridium difficile</i>	Patojenik	HMW gliko protein subunit	S-tabaka	Yapışma ve kolonizasyon sağlayabilir ve ya immun sistemden kaçarak virulansa katkı sağlarlar	Akut kolit; Anti biyotik bağlı ishal
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Patojenik	M-Protein	Hücre-duvarı	Kolonizasyon ve fagositoza direnç; Antijenik değişimin önemli nedeni	Purpureal ateş Skarlet ateş Farenjit,Erisipel
<i>Streptococcus salivarius</i>	Oral patojen	Protein antijen-C	Membran	Glikoprotein konakçı ilişkili adhezyon fonksiyonlarına aracılık eder	Diş çürümeleri
<i>Corynebacteriu m sepedonicum</i>	Pitotoksik	Pitotoksin	Salgı enzimi	Tohum ve kökleri enfekte eder ve ikincil çürümeye neden olan mikroorganizmalara izin verir	Patateste çürüme
<i>Bacillus thuringiensis subsp.- israelensis</i>	Entomosidal	Parasporal kristal protoksin	Hücresel lokalizasyon	Glikoprotein amino şekerleri sivrisinek bağırsak ında lektin reseptörlere bağlanır Konakçıyı enfekte eder	Larvisidal aktivite

OMP: Dış membran proteinleri

yinde kristalize olurken lipozoma sadece mekanik direnç kazandırmaz ayrıca moleküllerin çapraz-bağlama ve kovalent tutunması için mükemmel uçlar sağlarlar. Bu lipozomlar ilaç-taşıyıcı ve/veya teslimi, ilaç-hedefleme sistemi olarak kullanılabilirler. Dahası, S-tabaka örgü iyi tanımlanmış eleme ve boya ayırma karakteristikleri olan izopor ultrafiltrasyon membran oluşumunda kullanılabilir. Patojenik mikroorganizmalarda yüzey ve diğer glikoproteinler önemli virulans faktörleridir. Bu glikoproteinler aşı gelişiminde hedef olarak kullanmak için iyi olasılıklardır. Ek olarak, S-tabaka glikoprotein ürünleri intrinsik adjuvant özellik gösterdiklerinden aşı taşıyıcı olarak kullanılabilirler. Enzimatik aktiviteye sahip birçok bakteriyel glikoproteinler doğal termostabilite ve proteolitik degradesyona dirençlerinden dolayı endüstriyel öneme sahip olabilirler (17).

SONUÇ

Son 20 yıl içinde, protein glikozilasyonunun ökaryotik organizmalar ile sınırlı olduğu görüşü büyük oranda değişmiştir. Günümüzde birçok gözlemden prokaryotik glikokonjugatların, yüksek organizmalar veya bitkilerde bulunan glikoproteinler kadar yaygın olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin neredeyse tüm *Archeobacterial* S-tabakaları glikolize proteinler içermektedir. Ayrıca glikoproteinler tüm prokaryotik organizma gruplarında bulunmuştur. Yapıları ökaryotiklere göre çok farklıdır. Yinelenen birimlerin yapılarında bir türün yakın suşları dahi olsa önemli değişiklikler bulunmaktadır. Bakteriyel proteinlerin glikan kısımlarının biyolojik fonksiyonları hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Genellikle glikanların ökaryotik glikokonjugatların fonksiyonlarına benzer özellikler gösterdiği düşünülmektedir. *Archea* S-tabaka glikoproteinler kısa görünümüdürler, N-bağlı glikanlar, molekül yapısından yoksundurlar, karbonhidrat grubunu peptidoglikan kısım ile bağlarlar. *Eubakteri*'de uzun zincirli glikanlar protein zincirine O- veya N-bağlı olabilir, baskın tip O-glikozidik bağdır, *Archea*'da ise genelde baskın tip N-glikozidik bağdır ve bunlarda protein yapısına N-, O- veya her ikisiyle birden bağlanabilir. S-tabaka glikanlar bireysel alt birimlerindeki farklı polimerizasyon derecelerinden dolayı

zincir uzunluğunda büyük değişiklikler gösterir (10, 18).

Şu ana kadar çok az prokaryotik glikoprotein karakterize edilebilmiştir ve bu glikokonjugatların yapıları, biosentezi, moleküler biyolojisi ve fonksiyonları hakkında önemli pek çok soru cevaplanamamıştır. Moleküler biyolojileri ve muhtemel endüstriyel kullanım alanları yönünden yeni araştırmalar gerekmektedir (17, 18).

KAYNAKLAR

1. **Baenziger, J.U.** (1994) *Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it*. FASEB J., 8: 1019–1025.
2. **Bertozi C.R., Rabuka D.** (2009) *Structural Basis of Glycan Diversity*. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freze, H.H., Stanley, P., Bertozi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., (Eds): *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Chapter 2. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. **Ferguson, M.A.J.** (1999) *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*. J. Cell. Sci., 112: 2799–2809.
4. **Gagneux, P., Varki, A.** (1999) *Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function*. Glycobiology, 9 (8): 747–755.
5. **Hakomori, S.** (2002) *The glycosynapse*. Inaugural article. Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 225–232.
6. **Hooper, L.V., Manzella, S.M., Baenziger, J.U.** (1996) *From legumes to leukocytes: Biological roles for sulfated carbohydrates*. FASEB J., 10: 1137–1146.
7. **Kobata, A.** (1992) *Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins*. Eur. J. Biochem., 209: 483–501.
8. **Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., Dennis, J.W.** (2007) *Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation*. Cell, 129: 123–134.
9. **Letts, J.A., Rose, N.L., Fang, Y.R., Barry, C.H., Borisova, S.N., Seto, N.O.L., Palcic, M.M., Evans, S.V.** (2006) *Differential recognition of the Type I and II H antigen acceptors by the human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases*. J. Biol. Chem., 281: 3625–3632.
10. **Messner, P.** (1997) *Bacterial glycoproteins*. Glycoconj. J., 14: 3–11.
11. **Ohtsubo, K., Marth, J.D.** (2006) *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*. Cell, 126: 855–867.

12. **Prescher, J.A., Bertozzi, C.R.** (2006) *Chemical technologies for probing glycans*. Cell, 126: 851–854.
13. **Roseman, S.** (2001) *Reflections on glycobiology*. J. Biol. Chem., 276: 41527–41542.
14. **Schäffer, C., Messner, P.** (2004) *Surface-layer glycoproteins: an example for the diversity of bacterial glycosylation with promising impacts on nanobiotechnology*. Glycobiology, 14 (8): 31R-342.
15. **Schenk, B., Fernandez, F., Waechter, C.J.** (2001) *The in(side) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum*. Glycobiology, 11 (5): 61R–70R.
16. **Spiro, R.G.** (2002) *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 12 (4): 43R–56R.
17. **Upreti, R.K., Kumar, M., Shankar, V.** (2003) *Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications*. Proteomics, 3 (4): 363–379.
18. **Varki, A., Sharon, N.** (2009) *Historical background and overview*. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds): *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Chapter 1. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yazışma Adresi:

Erdem ÇİÇEK
Uzm. Gıda Mühendisi
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
09016, Işık/AYDIN.
E-mail: erdemcicek@mynet.com

BORNOVA VETERİNER KONTROL VE ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ DERGİSİ YAYIN KURALLARI

1. Dergi, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün bilimsel yayın organı olup, yılda bir kez yayınlanır. Derginin kısaltılmış adı Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. 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 kelimedenden 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 cümlenin 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*. JAVMA, 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*. 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 CONTROL AND RESEARCH INSTITUTE

1. This journal is the scientific publication of the Bornova Veterinary Control and Research Institute Directorate which is published once a year. The designation of the journal is Journal of Bornova Vet.Cont.Res.Inst.
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 Results:** 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*. JAVMA, 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*. 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., Mascaró, C. (1994) *New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, İzmir, 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 Copyright 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. Copyright fee is not paid to authors.

TELİF HAKKI DEVİR SÖZLEŞMESİ
Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi

Makalenin Başlığı:.....

.....

.....

Yazar/Yazarlar ve tam isimleri:

.....

.....

.....

Yayından 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 Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ve imza ederiz.

- a) Telif hakkı dışındaki patent hakları,
- b) Yazarların ders, kitap gibi çalışmalarında, sözlü sunumlarında ve konferanslarında makaleyi ücret ödemeksizin kullanabilmeleri,
- c) 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 Control and Research Institute

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 copright of the above mentioned manuscript is transferred to Journal of Bornova Veterinary Control and Research Institute, 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
--------------------------	-----------	------

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

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 DOĞANAY, 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 FİLAZİ, 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 HAZIROĐLU, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi
Prof. Dr. Rıfki HAZIROĐLU, 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.