



**VETERİNER KONTROL MERKEZ
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**
Etlik - ANKARA



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Cilt/Volume 33 ♦ Sayı/Issue 1 ♦ 2022

Yılda iki kez yayımlanır (Haziran-Aralık) / *Published two times per year (June-December)*

Yaygın süreli ve hakemli / *Peer-reviewed and published regularly*

Türkçe ve İngilizce / *Turkish and English*

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099

Sahibi / Owner

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına

On behalf of the Veterinary Control Central Research Institute

Dr. Cevdet Yaralı

Enstitü Müdür V. / *Director*

Yayın Kurulu / Publication Board

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor

Özcan YILDIRIM, Türkiye

Editör / Editor in Chief

Dr. Erdem DANYER, Türkiye

Dr. Selçuk PEKKAYA, Türkiye

Dil Editörleri / Copy Editors

Dr. Yeliz YIKILMAZ, Türkiye

Dr. F. İpek KESKİN, Türkiye

Tuğba Buket MERMER, Türkiye

Dr. Özlem ŞAHAN YAPICIER, Türkiye

Bilimsel Kurul* / Editorial Board

Dr. Erhan AKÇAY, Türkiye

Dr. Özlem ALTINTAŞ, Türkiye

Dr. Ali ERKURT, Türkiye

Dr. Sabri HACIOĞLU, Türkiye

Uzm. Yusuf Ziya KAPLAN, Türkiye

Uzm. Bahadır KILINÇ, Türkiye

Çağla KORKMAZ, Türkiye

Dr. Neslihan Akbulut TOSUN, Türkiye

* Kurullar soyada göre alfabetik dizilmiştir

Boards are listed alphabetically by surname

Danışma Kurulu / Advisory Board

Ertan AĞTÜRK, Foot and Mouth Disease Inst., Türkiye

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

İsmail AYDIN, Samsun Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Martin BACHMANN, Martin Luther Uni., Germany

Prof. Dr. Tanay BİLAL, İstanbul Uni., Türkiye

Dr. Erdim Ozan ÇAKIR, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

Doç Dr. Fethiye ÇÖVEN, Bornova Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Müge DOĞAN, Konya Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Aysel EKİNCİ, Vet. Cont. Inst., Türkiye

Yasemin ERDOĞAN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Ufuk EROL, Cumhuriyet Uni., Türkiye

Dr. Yasin GÜLCÜ, Konya Vet. Cont. Inst., Türkiye

Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ, Ondokuz Mayıs Uni., Türkiye

Prof. Dr. Murat GÜZEL, Ondokuz Mayıs Uni., Türkiye

Bünyamin İREHAN, Elazığ Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Günel İSMAİLOVA, Independent Consultant, Italy

Dr. Hamza KADI, Samsun Vet. Cont. Inst., Türkiye

Mehmet KARAKAYA, Foot and Mouth Disease, Türkiye

Ünal KILIÇ, Elazığ Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Emre OZAN, Ondokuz Mayıs Uni., Türkiye

Dr. Ediz Kağan ÖZGEN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Giulia RONCON, Utrecht Uni., The Netherlands

Dr. Fahriye SARAÇ, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

Osman SEZER, Adana Vet. Cont. Inst., Türkiye

Mehmet Ali SÖZMEN, Adana Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Özhan TÜRKYILMAZ, Bornova Vet. Cont. Inst., Türkiye

Prof. Dr. A.Erdem ÜTÜK, Çukurova Uni., Türkiye

Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Uni., Türkiye

Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Uni., Türkiye

Adres / Address: Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A
06020 Etlik - Ankara/TÜRKİYE Tel.: +90 312 326 00 90 (8 hat) Faks: +90 312 321 17 55

E-posta / e-mail: etlikdergi@tarimorman.gov.tr

İnternet adresi ve Arşiv / Web Site and Archive: <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez> • <https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd>

Hakem Listesi* / Reviewer List:

Prof. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU	Burdur Mehmet Akif Ersoy Veteriner Fakültesi Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi AD. Türkiye
Prof. Dr. Mehmet AKAN	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Oğuzhan AVCI	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Duygu BAKİ ACAR	Afyon Kocatepe Üniv. Veteriner Fakültesi Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi AD. Türkiye
Merve BİŞKİN	Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üye. Nüvit COŞKUN	Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Dr. Şahin ÇAKIR	TAGEM Hayvan Sağlığı, Gıda ve Yem Araştırmaları Daire Başkanlığı, Türkiye
Dr. Can ÇOKÇALIŞKAN	Şap Enstitüsü Tıp Tay. ve Mol. Epid. Laboratuvarı, Türkiye
Doç. Dr. Yavuz ÇOKAL	Bandırma Onyedil Eylül Üniv. Bandırma Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme/Teknolojisi Böl. Türkiye
Dr. Öğretim Üye. Fırat DOĞAN	Hatay Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üye. Irmak DİK	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Dr. Seda EKİCİ	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Gıda Kontrol Laboratuvarı, Türkiye
Doç. Dr. Göksel ERBAŞ	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Ayşe Gencay GÖKSU	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Timur GÜLHAN	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN	Kastamonu Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Sabri HACIOĞLU	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Viral Teşhis Laboratuvarı, Türkiye
Doç. Dr. Ömer HAZMAN	Afyon Kocatepe Üniv. Kimya Bölümü Biyokimya AD. Türkiye
Erol KABİL	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Doping Kontrol Laboratuvarı, Türkiye
Burak KARABULUT	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Kemal METİNER	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Dilek MUZ	Tekirdağ Namık Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üye. Emre OZAN	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Laboratuvar Hayvanları AD. Türkiye
Dr. Sibel ÖZÇAKMAK	Tarım ve Orman Bakanlığı Samsun İl Müdürlüğü, Türkiye
Prof. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Veterinerlik Patolojisi AD. Türkiye
Dr. Özlem ŞAHAN YAPICI	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bakteriyoloji Laboratuvarı, Türkiye
Mehmet Onur ÜLGEN	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Antraks Aşı Üretim Laboratuvarı, Türkiye
Dr. Öğretim Üye. Sinan VICIL	Yozgat Bozok Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD. Türkiye
Doç. Dr. Mustafa YİPEL	Hatay Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji AD. Türkiye

** İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir ve bu sayıda görev alanlar yazılmıştır.
Names are listed alphabetically by surname and this issues reviewers are written.*

ULAKBİM Yaşam Bilimleri, Türkiye Atıf Dizini, EBSCO, CAB Abstracts, AGRIS gibi ulusal ve uluslararası veri tabanları kapsamında dizinlenen DergiPark'da ücretsiz olarak açık erişimi bulunan, "en az çift kör hakemli" bir dergidir. Yazım kuralları ve HYPERLINK "<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd/indexes>" derginin indekslediği güncel veri tabanları hakkında bilgiye internet sitesinden ulaşabilirsiniz.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is a free-open access journal, that evaluated by at least double-blind reviewers; indexing in the scope of natinal and international datebases like, ULAKBİM life sciences, Turkish citation index, CAB abstracts and published on DergiPark system. "<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd/indexes>" You can find more information about instruction for authors and the updated databases in which the journal is indexed, from the journal website.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2022, Her hakkı saklıdır. / All rights reserved.
Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2022, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Designed and Pressed by



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

İçindekiler / Contents

Original Article / Özgün Araştırma

A comparative histopathological evaluation of acute toxicities associated with Scillaren-A, corn cob powder and their combinations in rats

Ratlarda Scillaren-A, mısır koçanı tozu ve kombinasyonları ile ilişkili akut toksisitelerin karşılaştırmalı histopatolojik değerlendirilmesi

Sedat Sevin, Mehmet Eray Alçıgır, Mustafa Özkurt, Zekeriya Yurdabakan, Ömer Yalçın, Ender Yarsan..... 1

Investigation of OvHV-2 virus in small ruminants in Western Turkey

Türkiye'nin batısındaki küçükbaş hayvanlarda OvHV-2 virusunun araştırılması

Kemal Pekmez, Murat Kaplan, Buket Özkan, Gülnur Kalaycı..... 12

Isolation of SARS CoV-2 and evaluation of human-animal cases

SARS CoV-2 izolasyonu ve insan hayvan vakalarının değerlendirilmesi

Sabri Hacıoğlu, Ahu Pakdemirli, Dilek Dülger, Erdem Danyer, Ümmü Sena Sarı, Özcan Yıldırım, Cevdet Yaralı 17

Protective effect of silymarin and boric acid against isoproterenol-induced myocardial infarction in mice

Farelerde izoproterenol ile indüklenmiş miyokard infarktüsüne karşı silimarin ve borik asidin koruyucu etkisi

Yaşar Şahin, Mehmet Eray Alçıgır, Filiz Bakar Ateş, Hüsamettin Ekici, Ali Şenol, Enes Gazi Atıcı, Ebru Yıldırım, Siyami Karahan 26

Serological survey and molecular investigation of Tick-borne encephalitis virus in Northern Turkey

Türkiye'nin kuzeyinde Tick-borne ensefalitis virüsünün serolojik ve moleküler araştırması

Gökhan Asal, Cüneyt Tamer, Harun Albayrak..... 34

Investigation of Restaurants in Beyoğlu Istanbul, in terms of Hygiene Criterias and Food Safety

İstanbul Beyoğlu ilçesi toplu tüketim yerlerinin gıda güvenliği ve hijyen kriterleri yönünden incelenmesi

Mehmet Hakan Tabak, Özer Ergün 40

Investigation of *mecA*, *vanA* and *pvl* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms

Küçük ölçekli süt işletmelerinde sığır mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerinin araştırılması

Muesser Yılmaz, Esra Seker 50

Agents isolated from horses with respiratory system infection signs

Solunum sistemi infeksiyon semptomlu atlardan izole edilen etkenler

Ayşe Ebru Borum..... 56

Düvelerde vajinal akıntılarının bakteriyolojik değerlendirilmesi

Bacteriological evaluation of vaginal discharges in heifers

Elçin Günaydın, Gülşen Goncagül..... 63

İn vitro lipopolisakkarit uyarımlı karaciğer yangı modelinde Alfa-Terpineol'ün etkinliğinin araştırılması

Investigation of the efficiency of Alpha-Terpineol in the in vitro lipopolisaccharide stimulated liver inflammation model

Ayşe Pınar Tunçer, Altuğ Küçükgül, Mehmet Mustafa İşgör..... 71

Klinik semptomlu tavuk ve hindilerden patojen *Mikoplazma* türlerinin multiplex PCR ile tanımlanması

Identification of pathogen *Mycoplasma* species using multiplex PCR from chickens and turkeys having clinical symptoms

Ayfer Güllü Yüce-tepe, Ahmet Murat Saytekin, Osman Yaşar Tel, Sevil Erdenliğ Gürbilek, İrfan Özgünlük, Oktay Keskin..... 79

Sıcaklık stresindeki bıldırcınlarda probiyotik uygulamasının ovidukt ve ovaryum morfolojisine etkileri

Effects of probiotic application on oviduct and ovarian morphology in quails under heat stress

Özge Yıldırım, Sadık Serkan Aydın, Ömer Korkmaz, Deniz Korkmaz, İsmail Demircioğlu, Nurcan Kırar, Şermin Top, Tuğra Akkuş, Birten Emre, Ali Tekçe..... 89

Case Report / Olgu Sunumu

Pathomorphological and immunohistochemical evaluation of chronic (isolated) organ tuberculosis in a cow

İneklerde kronik (izole) organ tüberkülozunun patomorfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi

Yavuz Ulusoy, Bahadır Kılınç, Halil Pir, Funda Terzi, Orhan Dudaklı 97

Review Article / Derleme

DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines and strategies

DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) aşı ve stratejileri

Asena Esra Erdem, Barış Sareyyüpoğlu..... 102

Tavuklarda Coronavirus ve Enfeksiyöz Bronşitis aşıları

Coronavirus and Infectious Bronchitis vaccines in chickens

Özlem Kardoğan..... 110

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Numune Gönderme Klavuzu 118



A comparative histopathological evaluation of acute toxicities associated with Scillaren-A, corn cob powder and their combinations in rats

Sedat Sevin¹ , Mehmet Eray Alçıgır² , Mustafa Özkurt³ , Zekeriya Yurdabakan⁴ ,
Ömer Yalçın⁵ , Ender Yarsan⁶

^{1,6} Ankara University, Veterinary Faculty, Department of Pharmacology and Toxicology, Ankara, Türkiye.

² Kirikkale University, Veterinary Faculty, Department of Pathology, Kirikkale, Türkiye.

^{3,5} Almer Pharmaceutical Food, Agriculture, Livestock, Veterinary, Consultancy, Industry Trade Limited Company, Ankara, Türkiye.

⁴ Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Faculty of Agriculture, Department of Zootechnics, Kahramanmaraş, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 04.01.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 01.09.2021

Abstract: The purpose of the study was to comparatively evaluate the efficacy of Scillaren-A in rats. A total of 32 female Wistar albino rats were used to develop acute toxicity for 48 h. The rats were randomly divided into four groups including n=8 / each group (G.I-G.IV). Toxicity groups (G.I, G.II, and G.III) and control group (G.IV) were established. The experimental groups were intoxicated with scillaren A, corn cob powder, and their combinations, respectively. The rats in the control group were remained intoxicated and fed with standard pellets. The experiment was ended 48 hours after the intoxication. Histopathological findings in vital organs (liver, kidney, lung, heart, brain) and then other organs (intestine, spleen) were evaluated. Tissues were fixed in 10% buffered formalin (pH=7.2) and embedded in paraffin. The histopathologic findings were evaluated on the standard H&E stained sections. The major histopathological changes, vascular changes including hyperemia and haemorrhagia, alterative changes including degeneration and necrosis, inflammation, some regenerative and reparative changes including hyperplasia and fibrosis in organs were scored. It is believed that both formulations can be effective on death later on, be utilized as a rodenticide without environmental toxic effect, and be consumed rapidly by rats due to their attractive chemical traits.

Keywords: Corn cob powder, histopathology, intoxication, rat, Scillaren-A

Ratlarda Scillaren-A, mısır koçanı tozu ve kombinasyonları ile ilişkili akut toksisitelerin karşılaştırmalı histopatolojik değerlendirilmesi

Özet: Çalışmanın amacı Scillaren-A'nın ratlarda etkinliğini karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir. Kırk sekiz saat boyunca akut toksisite geliştirmek için toplam 32 dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar rastgele dört gruba ayrıldı (her grupta n=8 / G.I-G.IV). Toksisite grupları (G.I, G.II ve G.III) ve kontrol grubu (G.IV) oluşturuldu. Deney grupları sırasıyla scillaren A, mısır koçanı tozu ve bunların kombinasyonu ile zehirlendi. Kontrol grubundaki ratlar zehirlenmedi ve standart peletler ile beslendi. Toksikasyondan 48 saat sonra deney sonlandırıldı. Yaşamsal organlarda (karaciğer, böbrek, akciğer, kalp, beyin) ve ardından diğer organlarda (bağırsak, dalak) histopatolojik bulgular değerlendirildi. Dokular %10'luk tamponlu formalin (pH=7.2) içinde tespit edildi ve parafine gömüldü. Histopatolojik bulgular standart H&E boyalı kesitlerde değerlendirildi. Organlardaki önemli histopatolojik değişiklikler, hiperemi ve hemorajiji içeren vasküler değişiklikler, dejenerasyon ve nekrozu içeren alteratif değişiklikler, yangı, hiperplazi ve fibrozis gibi bazı rejeneratif ve reperatif değişiklikler skorlandı. Her iki formülasyonun da ilerleyen zamanda ölüm gelişmesinde etkili olabileceğine, çevresel toksik etkisi olmaksızın bir rodentisit olarak kullanılabileceğine ve çekici kimyasal özellikleri nedeniyle ratlar tarafından hızla tüketilebileceğine inanılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Histopatoloji, mısır koçanı tozu, rat, Scillaren-A, toksikasyon

Introduction

Medicinal plants have been used to cure health disorders and to prevent diseases (Aktaş et al. 2020). They have been shown to exert various biological activities including anti-cancer (Bilir et al. 2018; Alp et al. 2019), antimicrobial (Keyvan et al. 2019), an-

tifungal (Mahlo et al. 2016), antiparasitic (Tutun et al. 2019), antioxidant (Kasote et al. 2015), and anti-hyperlipidemic (Sikarwar et al. 2014) properties. Today, various products are used to combat rodents. These products are mostly chemical, but there are also vegetable-based ones. For this purpose, one

Yazışma adresi / Correspondence: Sedat Sevin, Ziraat Mahallesi, Şht. Ömer Halisdemir Blv, 06110 Altındağ, Ankara, Türkiye
E-mail: sedatsevin59@gmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-0475-9092 • ²0000-0002-5165-5854 • ³0000-0002-1015-9344 •
⁴0000-0002-0887-0874 • ⁵0000-0002-9520-1600 • ⁶0000-0002-3008-9240

of the most widely used products nationally and internationally is the products obtained from corn cob powder. The rodenticidal activity of corn cob powder has been studied on both rats and mice and found useful in different countries on an international scale (Perry 2013; Jacob and Buckle 2018).

Urginea (Scilla) Maritima or squill, which is also known as sea onion, is located in the coastal Mediterranean area. It is obtained in powder form from the Liliaceae plant *Urginea (Scilla) Maritima*. It is an onion-like plant. Squill bulb extracts and dried powders have been used for the control of rodents since the 13th century. Although red squill has many alkaloids, scilliroside is the most toxic among others which provides rodenticidal activity. In particular, its bulbs have an anticoagulant activity and this chemical has a characteristic place among modern anticoagulant rodenticides (Gentry 1987; Gupta 2018). Some glycoside substances in squill bulbs; proscillaridin A, scillaren A, scilliroside, gammabufotalin, and scillirosidin were extracted. Among them, scilliroside toxicity is the most effective compared to others (Verbiscar et al. 1986a; Verbiscar et al. 1987b). For example, intake of *Urginea (Scilla) Maritima* at high doses or for a prolonged period is cardiotoxic or emetic. Scilliroside is inefficiently absorbed from the gastrointestinal tract and any remaining amount can be excreted via the urine. Due to a highly toxic bufadienolide glycoside, the red squill bulb can also cause a central nervous system failure. Thus, it causes convulsions and death as well as cardiovascular collapse (Tobyn et al. 2010).

Unfortunately, there are limited experimental studies regarding squilla glycosides, even though their active compounds have been well documented in numerous sources. According to the literature, Scillaren-A toxicants, red squill powder can contain up to 28% scilliroside, and baits usually have 0.01-0.7% of the toxicant (Gratz 1973). In an experimental study, approximately 0.8 mg/kg LD50 dosage of Scilliroside was found lethal (Brooks and Htun 1980). Another experimental study reported that the oral LD50 of Scilliroside was 0.7 mg/kg in male rats, 0.43 mg/kg in female rats, and 0.35 mg/kg in mice (Bayazit and Konar 2010). Thus, Scillaren-A is a highly toxic chemical and is used effectively against Norway rats, black rats, house mice, long-tailed field mice, and field voles (The Pestisit Manual 1983).

The product to be prepared as a part of the study will be composed of corn cob powder and active ingredients obtained from the squill plant to support it. One of the most important disadvantages of corn cob powder used as a rodenticide is its

high effectivity dose which provides active struggle with rodents. The priority approach that reveals the originality of the study starts at this point. The mechanism of action of neither corn cob powder nor squill glycosides for rats and mice has been fully elucidated. Various opinions were put forward and got accepted. In this study, the purpose was to comparatively evaluate the toxicity efficacy of Scillaren-A in rats. Thus, effective doses on the vital organs and the efficiency of different created formulations have been evaluated individually and collectively. It is believed that this study is the first comparative documentation on this topic based on literature knowledge.

Material and Method

Plant Material and Preparation of Ethanol Extract

U. Maritima (L.) Baker is grown mostly in the Aegean and Mediterranean regions of Turkey (Tanker and Tosun 1979). The leaves and tubers of *U. Maritima* (L.) Baker were collected from nature in Demirciler (Antalya, Manavgat, Turkey; Lat/Long 36.791924; 31.509417) in 2019 and cleaned from residual composts. The tubers were used directly in the extraction process after the bulbs are cut and finely crushed in the grinding machine (Spice Herb Grinder IC-25B).

Urginea Maritima (L.) Baker plant's tubers were ground mechanically with a machine (YOKEŞ, VBR-6000, Multi-Purpose Disperser). Following the grinding process, 2.4 kg for every 4 kg tubers were added to the scilla paste. *Urginea Maritima* (L.) Baker - magnesium sulfate paste was further diluted by 15 L of Ethanol (Merck) and blended by a high-speed blender with a maceration derivative system. To ensure total extraction, the paste was washed with 5 L of Ethanol before sieving. The added Ethanol (Merck) was evaporated by a Rotary evaporator and 1000ml of the concentrated sample was obtained. The concentrated paste was coagulated by lead acetate at pH values below 6.8 and the existing lead acetate was absorbed by 10% sodium sulfate, and sieved again. The sample was lastly washed with Chloroform (Merck) to separate fat and then analyzed by column chromatography (Zhao et al 2013; Xu et al 2019).

Preparation of pellet feeds containing corn cob powder and Scillaren-A

50 gram of 50% corn cob powder, 1 gram of 5.5% Scillaren-A extract, and 49 gram of feed mixture (peanut butter, gluten, cornmeal, wheat flour, sunflower) were mixed to obtain the pellet. The

mixture was processed through the pellet machine (Levent Makine) with sieves by forcing it to pass through the sieve by traveling on the weight. The high-speed mixer was run at 4000 rpm (Ujváry 2010).

Analysis of Scillaren-A by LC-MS / MS

Scillaren-A chemical detected by LC-MS / MS device in Akdeniz University Food Safety and Agricultural Research Centre was verified with NIST and Wiley libraries. LC-MS / MS System: Thermo Scientific Accela UHPLC- TSQ Quantum Access Max, Column: Hypersil GOLD RP C18 (1.9 µm), 50×2.1 mm, Column oven temperature: 40°C, Injection volume: 5 µL, Capillary temperature: 270°C, Evaporation temperature: 50°C, Auxiliary gas pressure (Arb): 20, Sheath gas pressure (Arb): 50, Spray Voltage (V): ± 3500 (Bălăşoiu et al 2013; Yadav 2020).

Experiment Protocol

Approval for the study was granted by the Local Ethics Committee, Turkey. The experimental animals were fed and sheltered in the Laboratory Animal Unit of Hüseyin Aytemiz Experimental Research and Application Center, Kirikkale University. A total of 32 adult female rats, each weighing 300-350 g, were kept in appropriate-sized cages at room temperature with 55% humidity, in a 12-hour day-night cycle and they were fed ad-libitum with standard pellet feed. Before the intoxication, all group animals were starved for 24 hours. The rats were randomly divided into four groups. Each group included 8 rats. The Group I (G.I) animals was administered with 4 ml Scillaren (*Urginea (Scilla) Maritima* (L.) extract) via gavage. The Group II (G.II) animals were fed with corn cob silk powder (25 g for each animal in the group) that was added to the pressed standard pellet and dissolved in 10 ml corn oil. The Group III (G.III) animal was first administered with 4 ml Scillaren extract via gavage and corn cob powder (25 g for each animal in the group). The Group IV (G.IV) animals were selected as control and fed with a standard pellet. They were not intoxicated by any toxic substance. After 48 hours, all animals in every group were euthanized one by one within the euthanasia chamber. Each rat was sedated with xylazine (10 mg/kg BW, IM) and allowed 2 mins for acclimation of 100% carbon dioxide gas infusion.

Postmortem examination

The routine necropsy procedure was performed. Organs of all animals in each group were evaluated properly based on general macroscopical criteria of necropsy. The tissue samples (liver, kidney, lung, heart, central nervous system parts, spleen, and intestine) were fixed in 10% buffered formalin. The routine tissue process was followed up using an automatic tissue processor (Leica TP-1020) and tissues were embedded in paraffin (Shandon). Thereafter, paraffin blocks were cut at 5 µm and stained accordingly to the hematoxylin-eosin (H&E) staining procedure (Luna 1968).

Histopathological examination

The lesions were examined and scored in terms of hyperemia, hemorrhage, degeneration-necrosis, and inflammatory cell infiltration.

Results

Scillaren-A quantity analysis

Urginea (Scilla) Maritima was extracted with ethyl alcohol containing 0.145 mg/kg amount of Scillaren-A.

Necropsy findings

In G.I, the small intestine was hyperemic in appearance (n=3). The large intestine was enlarged in a few animals (n=3). The liver and spleen as well as lungs were congested (n=4). The heart was stiffed in appearance. The central nervous system was edematous and swollen. In G.II, the intestines and stomach were enlarged in two animals. In addition to the kidney, the liver and spleen were hyperemic and swollen as in the previous group. The heart and central nervous system were the same in appearance in all animals. In G.III, the large intestine was enlarged, the mucosa of the small intestine was hyperemic partly. The stomach was normal and filled with pellet contents. The liver and spleen were congested in a few cases. The lungs and kidneys were hyperemic. The hearts and central nervous system were edematous and swollen. In G.IV or control group, there were no meaningful pathological changes in organs (Figure 1).

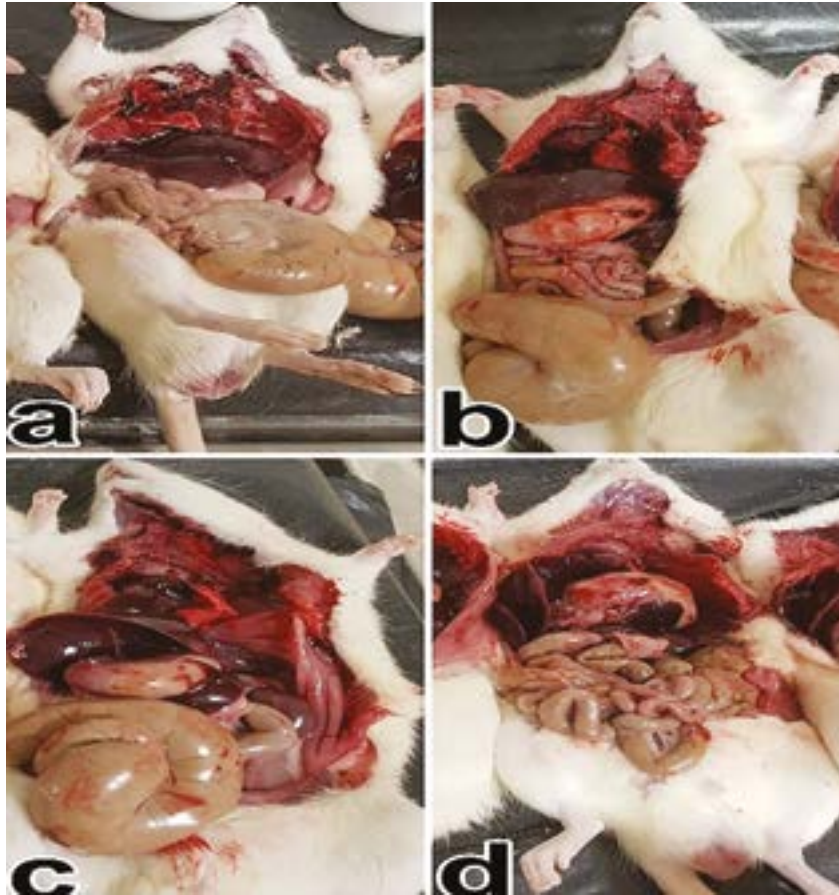


Figure 1. Macroscopical findings in experimental groups. (a) Group I animals, Scillaren extract via gavage, (b) Group II animals pressed powder of corn cob silk, (c) Group III animals, dough ball prepared from Scillaren extract and corn cob powder (d) Group IV animals, selected as control.

Histopathological results

Liver: In G.I, the sinusoids were filled with erythrocytes and the central vein was enlarged. Some of the remark cords were dissociated (n=4). There were many parenchymal degenerations in hepatocytes at the periphery of lobes (n=6). The severe changes included both nuclei and cytoplasm of some hepatocytes. In G.II, the aforementioned findings with venous congestion were not common at each lobe of the animal (n=5). In G.III, the congestion has spread to all lobules (n=7). Additionally, there was neutrophil leucocyte infiltration in a few areas in the experimental group. In contrast to the experimental group, in G.IV, there was no meaningful finding.

Kidney: In G.I, the cortical tubules were lined with degenerated epithelial cells in some areas (n=6). In G.II and G.III, the findings were such in case (n=7). But, the distribution of degenerated areas was fewer compared to other groups in G.III. In addition, the

capillaries were hyperemic in these groups (n=8). In G.IV, there was no conspicuous finding.

Heart: In G.I, loss of striates, karyolytic changes as well as vascular changes related to parenchymal degenerations in cardiomyocytes were disseminated (n=7). In G.II, these degenerative changes were observed focally in a few cardiomyocytes (n=8), although they were present in G.III animals (n=7) as much as in G.I animals. In G.IV, there was no pathological change.

Lungs: In G.I-II-III, the arterioles and interalveolar capillaries were filled and enlarged with erythrocytes as well as focal hemorrhagic foci (n=8 approximately at each group). In some cases, in these groups (n=5), edema was accompanied by hyperemia. In contrast to this, the vessels were normal in appearance in controls.

Spleen: In G.I and G.II, intrafollicular hemorrhage was observed disseminated (n=6). But, in other groups including the control group animals, there were not any meaningful changes in the tissue. Additionally, follicle hyperplasia was seen in a few areas in groups (n=3).

Intestine: In G.I and G.II, the capillaries were hyperemic in propria mucosa and submucosa (n=7). In G.III, degenerative and necrotic changes were encountered in the crypt and apical parts of the villus epithelium of the intestine, and hyperemic changes in the previous group (n=7). In G.IV, there were not any findings. Additionally, there were a few neutrophil leucocytes and lymphocytes infiltration in propria in some areas of experimental groups and control group animals.

Central Nervous System: In all groups, hippocampal neurons and Purkinje cells were degenerated or necrotic in appearance (n=8, approximately every group). However, such changes were fewer in G.III (n=5). And also, no lesion except hyperemia was observed in the control group or G.IV.

The findings were illustrated in Figures 2 to 5 and Table 1.

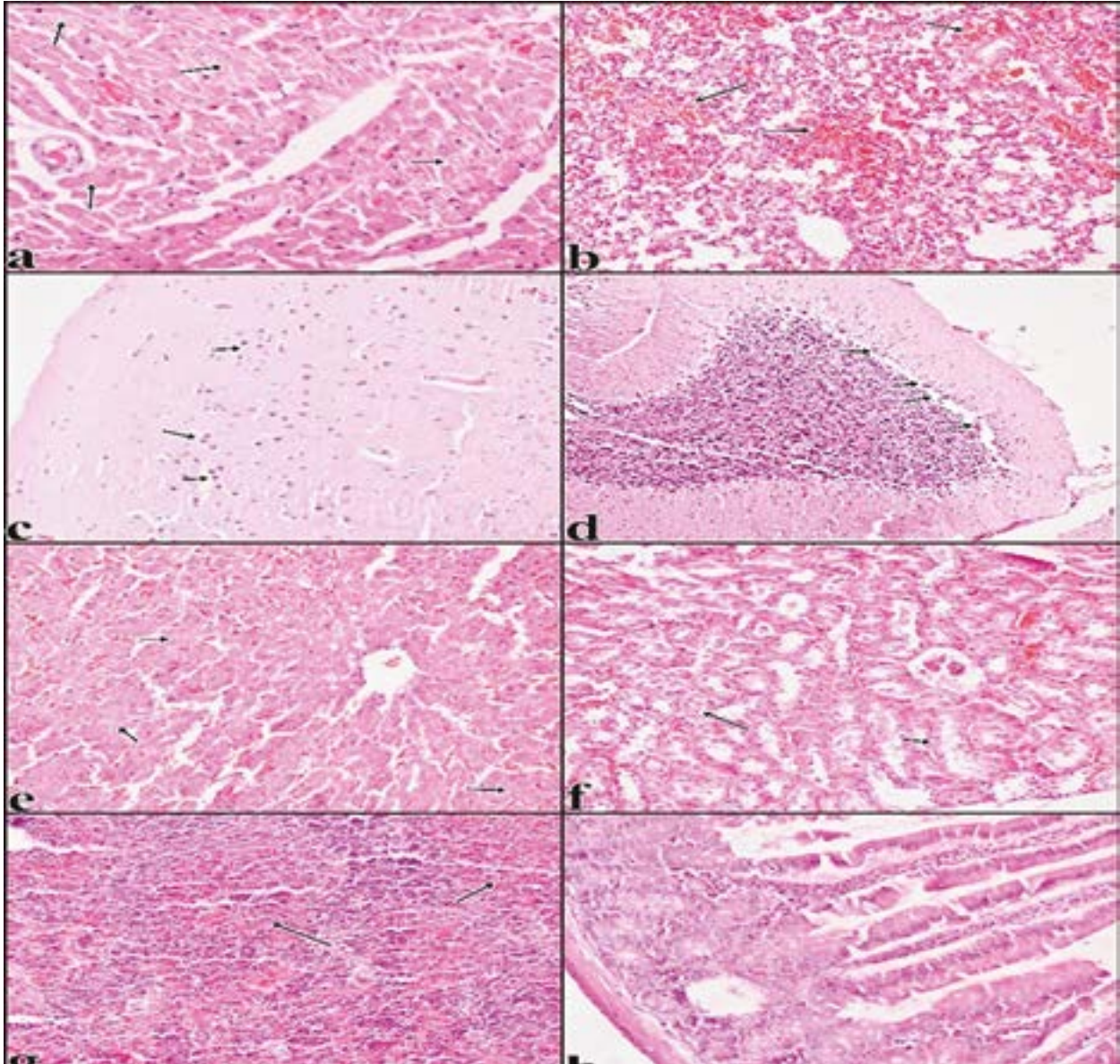


Figure 2. G.I. Focal hemorrhage, hyperemia, and degeneration-necrosis in cardiomyocytes. Degeneration and necrosis in the heart (a), focal haemorrhagia in the lung (b), degeneration and necrosis in Purkinje cell in the cerebellum (c), neuronal degeneration (d), degeneration in hepatocytes and hyperemia (e), hyperemia in the kidney (f), normal in appearance of the spleen (g), intestinal hyperemia (h), $\times 100$, Haematoxylin-Eosin staining.

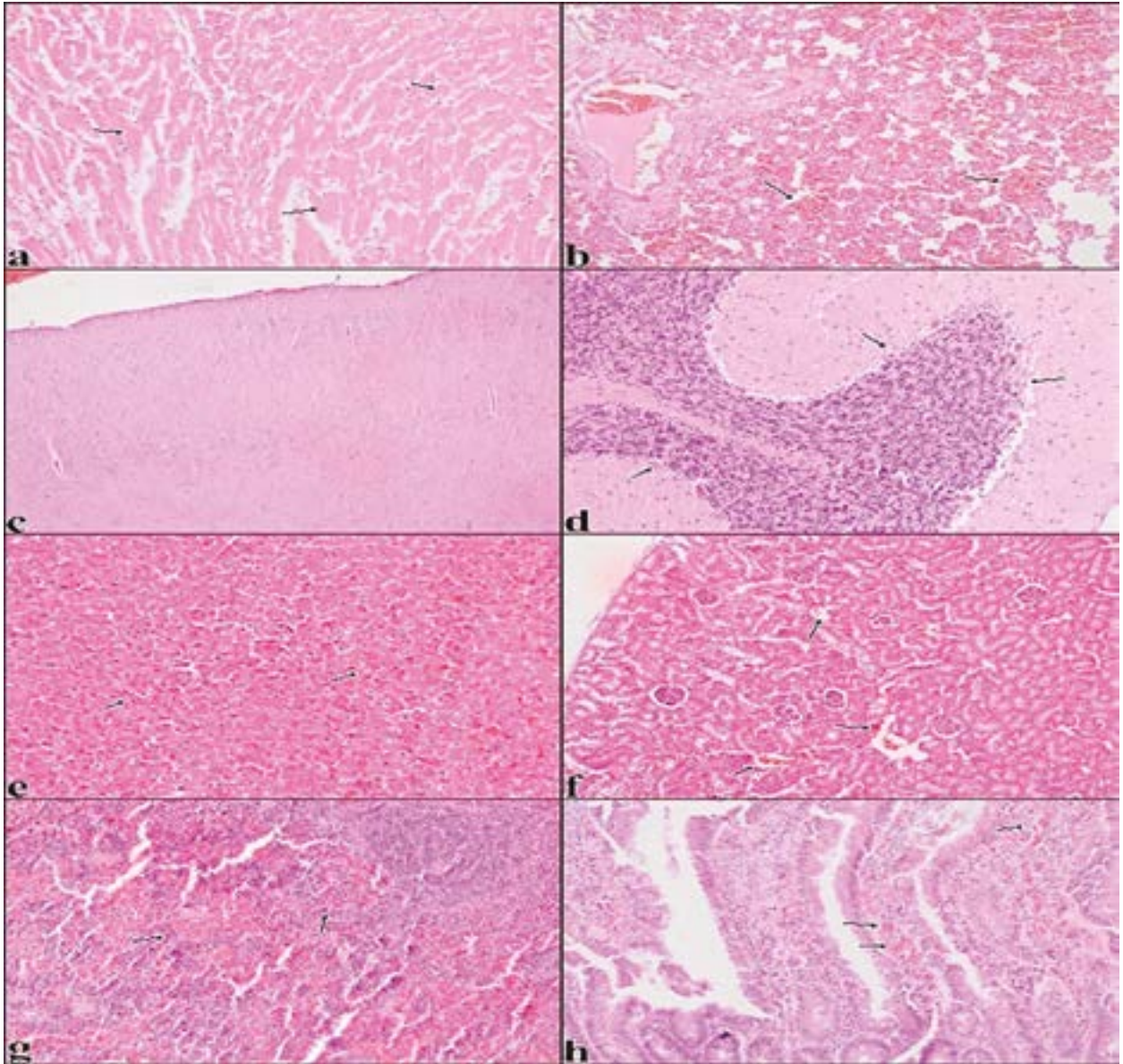


Figure 3. G.II. Disseminate hemorrhage, hyperemia, and degeneration and necrosis. Diffuse degeneration and necrosis in cardiomyocytes (a), diffusive hemorrhage and hyperemia in the lung (b), normal in appearance of the brain (c), degeneration and necrosis in the cerebellum (d), degeneration in hepatocyte and hyperemia in the liver (e), hyperemia in the kidney (f), diffuse hemorrhage in the spleen (g), intestinal hyperemia (h), $\times 100$, Haematoxylin-Eosin staining.

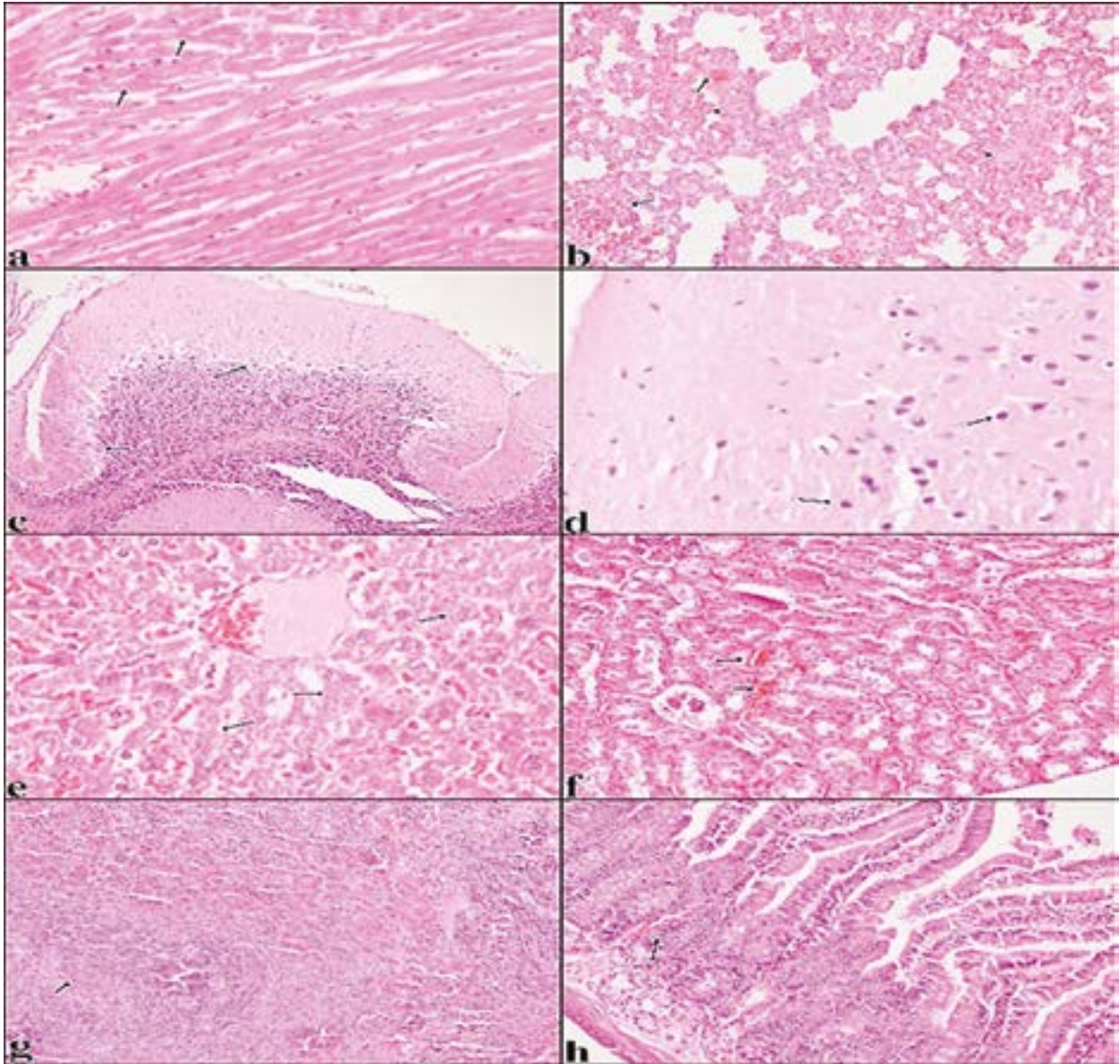


Figure 4. G.III. Disseminate hemorrhage, hyperemia, and degeneration and necrosis. Degeneration and necrosis in cardiomyocytes of almost all fields (a), diffusive hemorrhage and hyperemia in the lung (b), degeneration and necrosis in neurons of the cerebellum (c) and Purkinje cells of the cerebellum (d), degeneration in hepatocyte and hyperemia in the liver (e), severe hyperemia in the kidney (f), diffuse hemorrhage in the spleen (g), intestinal necrosis (h), $\times 100$, Haematoxylin-Eosin staining.

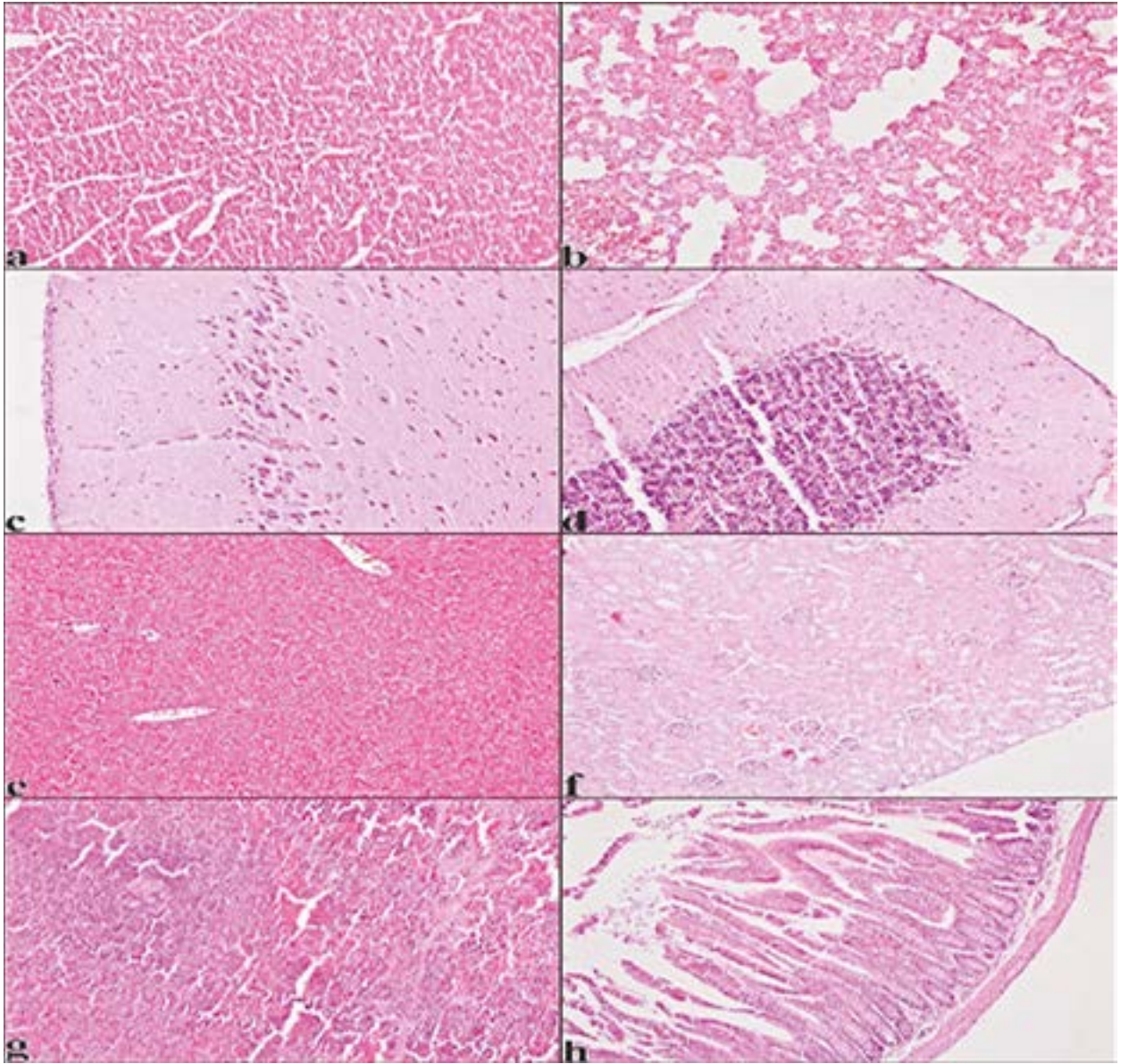


Figure 5. G.IV. No conspicuous pathological changes, heart (a), lung (b), cerebrum (c), cerebellum (d), liver (e), kidney (f), spleen (g), intestine (h), $\times 100$, Haematoxylin-Eosin staining.

Table 1. Scoring of Histopathological Findings in Organs According to Experiment Groups.

	Hyperemia	Haemorrhagia	Degeneration-necrosis	Inflammation	Hyplerplasia	Fibrosis
Liver	+++ G(I)	++ (GI)	++ G(I)	- (GI)	- G(I)	- G(I)
	++ G(II)	++ G(II)	++ G(II)	- G(II)	- G(II)	- G(II)
	+++ G(III)	+++ G(III)	+++ G(III)	- G(III)	- G(III)	- G(III)
	-G(IV)	- G(IV)	-G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)
Kidney	++ G(I)	+ (GI)	++ G(I)	- (GI)	- G(I)	- G(I)
	+++ G(II)	++ G(II)	+++ G(II)	- G(II)	- G(II)	- G(II)
	++ G(III)	+++ G(III)	++ G(III)	-G(III)	- G(III)	- G(III)
	- G(IV)	- G(IV)	-G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)
Heart	++ G(I)	+++ (GI)	++ G(I)	- G(I)	- G(I)	- G(I)
	+++ G(II)	+++ G(II)	+++ G(II)	-G(II)	- G(II)	- G(II)
	++ G(III)	+++ G(III)	++ G(III)	- G(III)	- G(III)	- G(III)
	- G(IV)	- G(IV)	-G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)
Lungs	++ G(I)	+ (GI)	+ G(I)	- (GI)	- G(I)	- G(I)
	++ G(II)	+ G(II)	+ G(II)	-G(II)	- G(II)	- G(II)
	+++ G(III)	++ G(III)	+ G(III)	- G(III)	- G(III)	- G(III)
	- G(IV)	- G(IV)	-G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)
Spleen	++ G(I)	++(GI)	++ G(I)	- (GI)	- G(I)	- G(I)
	+++ G(II)	+ G(II)	+++ G(II)	- G(II)	- G(II)	- G(II)
	++ G(III)	++ G(III)	++ G(III)	- G(III)	- G(III)	- G(III)
	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)
Intestine	++ G(I)	- (GI)	++ G(I)	- (GI)	- G(I)	- G(I)
	+++ G(II)	- G(II)	+++ G(II)	- G(II)	- G(II)	- G(II)
	++ G(III)	- G(III)	++ G(III)	- G(III)	- G(III)	- G(III)
	- G(IV)	- G(IV)	-G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)
Central Nervous System	++ G(I)	- (GI)	++ G(I)	- (GI)	- G(I)	- G(I)
	+++ G(II)	- G(II)	+++ G(II)	- G(II)	- G(II)	- G(II)
	++ G(III)	- G(III)	+++ G(III)	- G(III)	- G(III)	- G(III)
	+ G(IV)	- G(IV)	-G(IV)	- G(IV)	- G(IV)	- G(IV)

Discussion and Conclusion

In this study, a more effective rodenticide was developed by joining the structure of the corn cob powder of the active ingredient of Scillaren-A, which participates in the heterosite structures of the *Urginae Maritima* (L.) plant that is nationally and naturally grown for rodenticide use. The results obtained with this study are original for the usage of two different rodenticides together. This double rodenticide usage was seen to provide a multiple organ failure when compared to the sole usage of each rodenticide. In particular, it was encountered with these destructive effects in some of the vital organs such as the liver, kidney, and heart.

Corn cob powder is normally used for rats (*Rattus norvegicus*) at doses of 50-100 mg/kg. In most cases, corn cob powder is not efficient due to high dose requirement, therefore a more effective organic method is required. The addition of Scillaren-A to the rodent substance is important for improving combat effectiveness in this sense.

On the other side, *Urginea Maritima* (L.), or squill plant grows on sandy, rocky, and stony areas. *Urginea Maritima*, with an average weight of up to 2.5 kg, has been reported to have an active ingredient ratio of 0.4% to 0.5% (Verbiscar 1986b). This means that approximately 12-13 g of active ingredient can be extracted from an adult onion plant. This value

means approximately 500-700 *Rattus norvegicus* deaths in intravenous use (Brooks and Htun 1980).

It is aimed to lower the active substance dose to be given to mice/rats orally compared to the currently used rodenticides. On the other hand, it is known that many active substances used as pesticides today may also have a repellent effect on living creatures. In addition, it is seen that long-term use of pesticides causes resistance between generations. In *Rattus norvegicus*, the central olfactory unit can adapt to different odors. In this study, it was observed that the mixture prepared with Scillaren-A and pure corn cob powder did not show any repellent effect and was consumed with great appetite. With ByPass Proteins, which will be included in the rodenticide structure, the livings'/alive death that occurs between a few hours and 2 days under normal conditions will be extended to a period of 2-10 days. By this, the death of the animal in the places such as granary, field, or home interiors where the direct application is made will be prevented at the maximum level.

Among the histopathological changes in this group of animals, the presence of more severe and widespread bleeding, widespread necrosis and degenerations in cells in the heart muscle, edema related to general circulatory failure, and hyperemia have been observed. In addition, more common necrotic changes have been observed in the intestines of several animals and it has been concluded that this may be documented for toxicity. As a general picture, it was observed that the findings were similar to the corn-cob silk formulation and gave close results to the commercial formulation.

Different degrees of lesions were formed in the organs of all intoxicated groups. It is understood from the rapid development of deaths that the most severe findings were obtained with a ready-made commercial formulation. However, the administration of powder of corn cob powder and scillaren, which has a stronger effect than the corn cob silk formulation, seems to cause widespread damage to the organs. It was noticed that although organ damage occurred in the mentioned regions, it was mainly effective in hepatocytes, kidney tubules, and the heart muscle. Therefore, the disorder in the general circulation fails in the liver and kidney functions. Also, it causes slow death in the other affected organs such as the lung and brain. Both rodenticide formulations can create a more harmful effect in multiple organs at the same period. For this reason, by combining different aromatic properties and adding attractive odor and taste additives, both

rodenticides might be an effective formulation after careful calculations to increase the relative amount of scillaren extract and to maintain the amount of toxic substance per animal.

Acknowledgment: This research study is original and is not submitted anywhere as full text or abstract. And, the authors have no conflict of interest with any researchers.

Ethics Committee: This study was carried out with the permission of the Kirikkale University Animal Experiments Local Ethics Committee, Kirikkale, Turkey (Decision No: 06.11.2019-2019/12-57) report.

Funding: The research work was supported by grants of the KOSGEB Project.

References

- Aktaş İ, Özmen Ö, Tutun H, Yalçın A, Türk A. (2020) Artemisinin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Biotech Histochem.* 95,121-128. doi: 10.1080/10520295.2019.1647457
- Alp H, Tutun H, Kaplan HM, Şingirik E, Altıntaş L. (2019) Investigation of apoptotic effects of hypericum perforatum extract on breast cancer cell line. *Harran Üniv Vet Fak Derg* 8, 198-202. doi: 10.31196/huvfd.667748
- Bălăşoiu L, Călina D, Docea A, Patru E, Valse E, Maria B. (2013) Determination of cardiac glycosides in *Scilla bifolia* (Liliaceae) by two different analytical techniques: Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS). *J Med Plants Res.* 7, 3131-3138. doi:10.3906/zoo-1611-32
- Bayazit V, Konar V. (2010) Analgesic effects of scilliroside, proscillaridin-a and taxifolin from squill bulb (*Urginea maritima*) on pains. *Digest J Nanomaterial Biostruct.* 5, 465-467.
- Bilir EK, Tutun H, Sevin S, Kismali G, Yarsan E. (2018) Cytotoxic effects of *Rhododendron ponticum* L. extract on prostate carcinoma and adenocarcinoma cell line (DU145, PC3). *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 24, 451-457. doi: 10.9775/kvfd.2017.19219
- Brooks JE, Htun PT. (1980) Laboratory evaluation of scilliroside used as a rodenticide against the lesser bandicoot rat, *Bandicota bengalensis*. *J Hygiene.* 85,227-234. doi:10.1017/S0022172400063269.
- Gentry HS, Verbiscar AJ, Banigan TF. (1987) Red squill (*Urginea maritima*, Liliaceae). *Economic Botany.* 41, 267-282. doi: 10.1007/BF02858974
- Gratz NG. (1973) A critical review of currently used single-dose rodenticides. *Bull WHO.* 48, 469-477.
- Gupta RC. (2018) Non-Anticoagulant Rodenticides. Gupta RC eds. *Veterinary Toxicology.* Third edition. USA: Academic Press; p. 613-626.
- Jacob J, Buckle A. (2018) Use of anticoagulant rodenticides in different applications around the world. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife.* Springer, Cham.USA p. 11-43. doi: 10.1007/978-3-319-64377-9_2

- Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. (2015) Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int J Biol Sci*. 11, 982. doi: 10.7150/ijbs.12096
- Keyvan E, Tutun H. (2019) Effects of carvacrol on *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk. *Medycyna Weterynaryjna-Vet Med Sci Pract*. 75, 238-241. doi: 10.21521/mw.6211
- Luna LG. (1968) Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Third edition. New York USA: McGrawHill.
- Mahlo SM, Chauke HR, McGaw L, Eloff J. (2016) Antioxidant and antifungal activity of selected medicinal plant extracts against phytopathogenic fungi. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 13, 216-222. doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.28
- Perry SC. (2013) U.S. Patent No. 8,574,638. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2013.
- Sikarwar MS, Patil MB. (2014) Antihyperlipidemic activity of *Pongamia pinnata* leaf extracts. *Turk J Pharmaceut Sci*. 11, 329-338.
- Tanker M, Tosun F. (1979) Ege yöresinde yetişen *Urginea maritima* (L.) Bak. soğanlarının Prosillaridin yönünden değerlendirilmesi: Evaluation of the Balbs of *Urginea maritima* (L.) Bak. Growing in the Aegean District from. *J Facult Pharm Ankara Univ*. 9, 1-11.
- The Pesticide Manual. (1983) Worthing CR, Walker SB. eds. *A World Compendium*. Seventh edition. British Crop Protection Council, England: Croydon; p. 697.
- Tobyn G, Denham A, Whitelegg M. (2010) The western herbal tradition: 2000 years of medicinal plant knowledge. Singing Dragon, UK: Churchill Livingstone; p. 1-392. doi:10.1016/B978-0-443-10344-5.00020-3
- Tutun H, Koç N, Kart A. (2018) Plant essential oils used against some bee diseases. *Turkish J Agricult-Food Sci Tech*. 6, 34-45. doi: 10.24925/turjaf.v6i1.34-45.1502
- Ujváry I. (2010) Pest control agents from natural products. Kriger R. eds. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. USA: Academic Press; p. 119-229. doi: 10.1016/B978-0-12-374367-1.00003-3
- Verbiscar AJ, Patel J, Banigan TF, Schatz RA (1986a). Scilliroside and other scilla compounds in red squill. *J Agricult Food Chem*. 34, 973-979. doi: 10.1021/jf00072a011
- Verbiscar AJ, Banigan TF, Gentry HS. (1986b) Recent research on red squill as a rodenticide. Salmon TP. eds. *Proceedings of the 25th Vertebrate Pest Conference*. University of California, USA: Davis; p. 51-56.
- Xu S, Wang G, Guo R, Zhang J. 2019. Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves by high-speed shear homogenization extraction. *J Food Proc Preserv*. 43(12), e14250. doi: 10.1111/jfpp.14250
- Yadav PB, Lekhak UM, Ghane SG, Lekhak MM. (2020) Phytochemicals, antioxidants, estimation of cardiac glycoside (Scillaren A) and detection of major metabolites using LC-MS from *Drimys* species. *South African J Botany*. doi: 10.1016/j.sajb.2020.05.002
- Zhao J, Zhang W, Zhang X, Zhang X, Lu C, Deng Y. (2013) Extraction of cellulose nanofibrils from dry softwood pulp using high shear homogenization. *Carbohydr Polymer*. 97: 695-702. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.050



Investigation of OvHV-2 virus in small ruminants in Western Turkey

Kemal Pekmez^{1*}, Murat Kaplan², Buket Özkan³, Gülnur Kalaycı⁴

^{1,2,3,4} Izmir/Bornova Veterinary Control Institute, Department of Virology, Izmir, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 27.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 22.04.2022

Abstract: Malignant catarrhal fever (MCF) is a fatal disease of ruminants and has a worldwide distribution. The MCF virus (MCFV) group has currently known to contain 10 members. Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2) is one of the members of MCFV group and has economically importance in cattle. Sheep is the reservoir host of OvHV-2 while domestic goat is naturally susceptible species, although infection is generally asymptomatic in goat. In this study, the presence of OvHV-2 was investigated in sheep and goats by hemi-nested PCR in Aegean Region of west Turkey. Total of 138 sheep and goat samples which consist of 73 whole blood, 39 internal organs and 26 aborted fetuses were investigated. Thirty-seven blood samples, four fetal samples, and seven internal organ samples were found to be OvHV-2 positive. While 47 of the total sheep samples were found to be positive, only one goat sample was found positive. Similarly, previous studies have shown that prevalence of OvHV-2 in goats lower than sheep.

Key words: Goat, malignant catarrhal fever (MCF), ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2), sheep

Türkiye'nin batısındaki küçükbaş hayvanlarda OvHV-2 virusunun araştırılması

Özet: Malignant Katharal Fever (MCF) ölümcül bir geviş getiren hastalığıdır ve dünya çapında bir dağılıma sahiptir. MCF virusu (MCFV) grubunun şu anda 10 üye içerdiği bilinmektedir. Ovine gamaherpesvirus-2 (OvHV-2), MCFV grubunun üyelerinden biridir ve sığırlarda ekonomik olarak öneme sahiptir. Koyunlar, OvHV-2'nin rezervuar konağıdır ve keçiler ise doğal olarak duyarlı türdür, ancak enfeksiyon genellikle keçilerde asemptomatiktir. Bu çalışmada, OvHV-2'nin Türkiye'nin batısında yer alan Ege Bölgesindeki koyun ve keçilerdeki varlığı hemi-nested PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Yetmiş üç tam kan, otuz dokuz iç organ ve yirmi altı abort fütüsten oluşan toplam yüz otuz sekiz koyun ve keçi örneği incelendi. Otuz yedi kan örneği, dört abort fütüs ve yedi iç organ örneği OvHV-2 virusu yönünden pozitif bulunmuştur. Toplam koyun örneklerinin kırk yedisi pozitif olarak bulunurken sadece bir keçi örneği pozitif bulunmuştur. Önceki çalışmalar ile benzer olarak keçilerde OvHV-2 prevalansının koyunlardan daha düşük olduğunu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Keçi, koyun, malignant kataral fever (MCF), Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2)

Introduction

Malignant catarrhal fever is a letal disease in cattle, water buffalo, American bison, and other wild ruminants (Russell et al. 2009; Stahel et al. 2013). It is characterized by lymphoid cell accumulations in non-lymphoid organs, lymphocytic hyperplasia in lymphoid organs and vasculitis (Anonymous, 2018). The typical clinical findings of the disease are severe nasal discharge and fever (O'Toole et al. 2002). In addition, inflammation, erosion and mucopurulent exudation (in upper respiratory tract, oral mucosa and eyes), swollen nodules, lameness and neurological findings can be observed (Li et al. 2005).

The MCF virus (MCFV) group is currently known to contain 10 members. Six of these (AIHV-1, AIHV-2, OvHV-2, CpHV-2, MCFV-WTD and Ibex-MCF) cause naturally disease in susceptible species while

one of these (HipHV-1) cause disease experimentally in rabbits and others viruses (Gembok-MCFV, Muscov-MCFV, Aoudad-MCFV) are yet to be associated with disease (Li et al. 2014). All members of the MCFV group belong to the genus *Macavirus*, sub-family *Gammaherpesvirinae*, family *Herpesviridae* (ICTV 2020). Herpesviruses are enveloped, 120–250 nm with icosahedral symmetry. The genome consists of double-stranded, linear DNA 180 kb long (Knowles 2011). The OvHV-2 genome consists of 130,930 bp, with a G+C-rich. The genome have 73 ORFs and 62 of them demonstrate homology with other gammaherpesviruses (Hart et al. 2007).

OvHV-2 and AIHV-1 are reported to be the major causing agents of the disease that cause more significant economic loss in ruminants (Stahel et al. 2013). Although AIHV-1 does not cause disease in its natural host, the African antelopes, it causes dis-

ease in cattle in Africa and various ruminant species in zoos all over the world (Horner and Tham 2003). OvHV-2 is widespread in the sheep populations around the world and causes sheep-associated malignant catarrhal fever (SA-MCF) in some ruminants (Cunha et al. 2012; O'Toole and Li 2014). It is reported that the infection is generally subclinical in sheep, which are the reservoir host for OvHV-2. However, MCF-like clinical symptoms such as fever and nasal discharge were reported to occur in sheep exposed to a high dose of OvHV-2 via aerosol route (Li et al. 2005; Sood et al. 2013; O'Toole and Li 2014). Domestic goat is one of the naturally susceptible species for OvHV-2. Infection in goats is generally asymptomatic, but OvHV-2 induced MCF like lesions have been reported (Jacobsen et al. 2007; O'Toole and Li 2014).

Although malignant catarrhal fever caused by OvHV-2 is reported to be sporadic in cattle and other species, it may cause outbreaks when cattle are husbandried with other species susceptible to MCF or somehow in contact (Li et al. 2000; Schultheiss et al. 2000; Brenner et al. 2002; Otter et al. 2002; Twomey et al. 2002; Li et al. 2008; Neimanis et al. 2009; Vinod Kumar et al. 2014). MCF cases caused by SA-MCF have been reported in several regions in Europe, Canada, North and South Africa, Asia, and Middle East (Brenner et al. 2002; Benazzi et al. 2004; Neimanis et al. 2009; Gelaye et al. 2013; Vinod Kumar et al. 2014).

In this study, the presence of DNA of OvHV-2 was investigated by hemi-nested PCR in sheep and goat raised in the Aegean region of Turkey.

Materials and Methods

Samples and Preparation

The samples used in the study were randomly selected from the routine diagnostic materials sent to the Virology department of İzmir / Bornova Veterinary Control Institute. A total of 138 sheep and goat samples consist of 73 whole blood, 39 internal organs and 26 aborted fetus were collected from 19 different goat and sheep herds from 7 provinces of the Aegean region located in west of Turkey. Distribution of the samples as provinces are shown in Table 1. Whole blood samples were used directly. The internal organ and fetus samples were homogenized in PBS (1/10 v/v) then homogenate was centrifuged at 3000 rpm and 15 min and supernatants

were used for DNA extraction. In fetus samples, if internal organs available, same protocol as adult animals were used whereas whole fetus was used in cases of early abortion in which internal organs were not developed.

DNA extraction and Hemi-nested PCR

Commercial kit (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Germany) was used for DNA extraction and extraction was carried out according to the manufacturer's instructions.

DNA amplification was carried out by hemi-nested PCR protocol targeting the DNA polymerase gene described previously (Flach et al. 2002). For the first and second amplification POL1: 5'-GGC (CT) CA (CT) AA (CT) CT ATG CTA CTC CAC-3' and POL2: 5'-ATT (AG) TC CAC AAA CTG TTT TGT-3', POL2 and OHVPol: 5'-AAA AAC TCA GGG CCA TTC TG-3' primer sets were used, respectively. The expected amplicon length for the first and second PCR products were 386 bp and 172 bp, respectively. PCR reaction was carried out by using a commercial kit (Fast cycling PCR kit, Qiagen, Germany). The reaction mixture contained 10 µl Fast PCR Mastermix, 5 µl DNA template, 3 µl H₂O and 1 µl (10 µM) of each primer. For the first run thermocycle profile was; initial denaturation at 95°C 15 min, following 25 cycles of DNA denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 1 min, primer extension at 72 °C for 1 min and final extension step at 72°C for 10 min. The conditions of the second run were the same as the first run but were performed in 30 cycles instead of 25 cycles. Final PCR products were analyzed by in 1.5 % agarose (containing ethidium bromide) gel electrophoresis and visualised under UV light source. Positive and negative controls were used in each PCR analysis.

Results

In this study, a total of 138 samples were examined and 48 samples were found positive. According to sample type, 37 of 73 (51%) blood samples, 4 of 26 (15%) fetal samples, and 7 of 39 (18%) internal organ samples were found to be positive. Consistent with the literature, it was observed that the rate of OvHV-2 virus in sheep is higher than in goats. Figure 1 shows the PCR visualization.

Distribution of the samples and PCR results as provinces are sum up in Table 1.

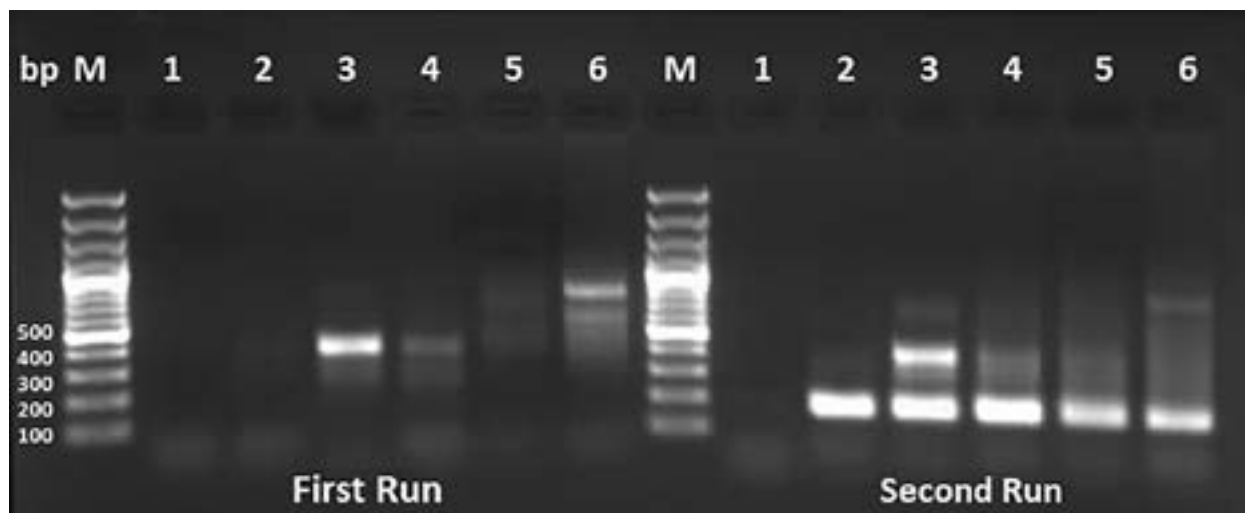


Figure 1. PCR result image. bp: base pair, M lane:100-bp ladder; 1: negative control, 2: positive control, 3: organ samples; 4,5: whole blood samples; 6: fetus.

Table 1. Distribution of samples by provinces

Table 1. Distribution of samples by provinces

Provinces	Whole blood				Internal organ				Aborted fetus				Total	Positive Rate %
	Sheep		Goat		Sheep		Goat		Sheep		Goat			
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N		
İzmir	1	6	0	1	2	10	0	8	2	7	1	2	40	15
Aydın	7	5	-	-	0	3	-	-	0	2	-	-	17	41
Denizli	0	1	-	-	1	0	-	-	0	1	0	1	4	0
Kütahya	1	1	-	-	2	1	0	2	1	1	0	1	10	40
Manisa	7	3	0	5	1	0	-	-	0	2	0	1	19	42
Muğla	21	6	0	8	1	3	0	2	-	-	0	2	43	51
Uşak	-	-	-	-	0	3	-	-	0	2	-	-	5	0
Total	37	22	0	14	7	20	0	12	3	15	1	7	138	34

P: positive N:negative, -: not sampled

P: positive N:negative, -: not sampled

Discussion and Conclusion

SA-MCF is the most common form of the disease and leads to outbreaks with high mortality rates in cattle kept together with sheep all over the world (O'Toole et al. 2002; Schultheiss et al. 2000; Otter et al. 2002; Twomey et al. 2002; Li et al. 2008).

The presence of MCF in Turkey have been severely reported as follows; Yazıcı et al. (2006) reported that antibodies were not present in the blood serum of the 150 randomly selected apparently healthy sheep in the Samsun province while antibodies were present in the blood serum samples of 18 of the 29 apparently healthy cattle (62%). Yeşilbağ (2007) reported that seroprevalence was 97.5%, 96%, 15%, respectively in sheep, goat and cattle in

Marmara Region. Yıldırım et al. (2012) detected DNA of OvHV-2 in 2 samples in 7 nasal and 9 conjunctival swab samples collected from sheep.

In this study, the presence of OvHV-2 was investigated in the whole blood, internal organ and aborted fetus samples from seven provinces situated in the Aegean Region. In goat, all of 14 whole blood and 12 internal organ samples were found negative while OvHV-2 virus DNA was detected in just one of 8 fetus samples. In sheep, OvHV-2 virus DNA was detected in 37 of the whole blood samples (62.7%), 7 of the internal organ samples (25.9%), 3 of the fetus samples (16.6%), and 45.1% of all sheep samples. Similarly, previous studies have showed that prevalence of OvHV-2 in goats lower than

sheep (Wiyono 1999; Banumathi et al. 2008; Khudhair et al. 2020).

It is reported that OvHV-2 transmission is generally horizontal way, while vertical transmission is rarely. Disease-free herds could be created by separating the lambs at the proper time (at 2.5 months) but adult sheep are as susceptible to the disease as lambs (Li et al. 1998, 2000). Although nasal secretion is reported to be the major route of transmission, a study found that the agent is present in 27 different organs and tissues including the genitalia, which suggests that the agent may be transmitted through other routes as well (Li et al. 2001; Hüseyin et al. 2002; Li et al. 2004). Headley et al. (2015) reported transplacental transmission in cattle. Dashty (2015) identified the OvHV-2 virus in cattle uterus and foetal placenta and reported that transuterine transmission may be occurred. Although the OvHV-2 DNA could not be identified in the uterus of the sheep, detection of the viral DNA in the placental epithelium, stromal fibroblasts, and vascular endothelial cells indicates that could be possible intrauterine fetal infection. Li et al. (1998) found no DNA or antibodies in 4 fetus samples collected from OvHV-2 positive sheep in last 5 days of the pregnancy, and no antibodies in the 118 serum samples collected from the lambs of OvHV-2 positive sheep before presuckling lambs. However, in two (twins) out of 77 lambs, the OvHV-2 virus was detected in the peripheral blood leukocyte (PBL) samples using the PCR technique. In this study, four aborted samples found to be positive.

Prevalence of MCF-antibodies in goats in the Marmara region, which is bordering to the Aegean region, was reported 96% (Yeşilbaş 2007). In our study all whole blood and internal organ samples obtained from goats were found to be negative for DNA of OvHV-2. When we compare these two studies, it is thought that the differences in results may be due to the methods used.

In conclusion, the fact that the OvHV-2 virus was detection in sheep is 45% in the Aegean region shows that more extensive investigation of the virus presence in sheep and cattle population in the region, is needed. In addition, detection of the virus in 4 (s-3, g-1) aborted fetuses shows that detailed studies are needed regarding the transplacental transmission of the OvHV-2 virus in sheep and goat.

References

- Anonymous (2018) Malignant Catarrhal Fever. Accession link: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.13_MCF.pdf. Accession date: 02.05.2019.
- Banumathi N, Sood R, Patil SS, Subramanian M, Pradhan HK. (2008) Genomic detection of ovine herpesvirus-2 in South Indian sheep and goat. *Indian J Anim Sci.*; 78, 13-16.
- Benazzi C, Gentile A, Brunetti B, Sconza S, Sarli G. (2004) A case of malignant catarrhal fever by OHV-2 in Italy. *Biomed Res.* 15, 107-109.
- Brenner J, Perl S, Lahav D, Garazi S, Oved Z, Shlosberg A, David D. (2002) An unusual outbreak of malignant catarrhal fever in a beef herd in Israel. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49, 304-307.
- Cunha CW, Gailbreath KL, O'Toole D, Knowles DP, Schneider DA, White SN, Taus NS, Davies CJ, Davis WC, Li H. (2012) Ovine herpesvirus 2 infection in American bison: virus and host dynamics in the development of sheep-associated malignant catarrhal fever. *Vet Microbiol.* 159, 307-319.
- Dashty MA. (2015) Infection of the Ovine herpesvirus 2 in the reservoir host, sheep, and the susceptible host, cattle. PhD thesis, University of Liverpool, Liverpool.
- Flach EJ, Reid H, Pow I, Klemm A. (2002) Gamma-herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res Vet Sci.* 73, 93-99.
- Gelaye E, Mekonnen GA, Jenber S, Ayelet G. (2013) Detection of sheep associated malignant catarrhal fever from clinical cases in Ethiopian cattle. *Rev Sci Tech.* 32, 851-856.
- Hart J, Ackermann M, Jayawardane G, Russell G, Haig DM, Reid H, Stewart JP. (2007) Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genom. *J Gen Virol.* 88, 28-39.
- Headley SA, Pimentel LA, Oliveria VHS, Toma HS, Alfieri AF, Carvalho AM, dos Santos MD, Alfieri AA. (2015) Transplacental transmission of ovine herpesvirus 2 in cattle with sheep-associated malignant catarrhal fever. *J Comp Pathol.*; 153, 206-211.
- Horner GW, Tham KM. (2003) Malignant Catarrhal Fever Accession link: <https://www.agriculture.gov.au/animal/health/laboratories/procedures/anzsdp/malignant-catarrhal-fever>, Accession date: 05.05.2021.
- Hüseyin D, Janett F, Albini S, Stäuber N, Thun R, Ackermann M. (2002) Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. *J Clin Microbiol.* 40, 4700-04.
- ICTV (2020) International Committee on Taxonomy of Viruses. Accession link: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202101497 Accession date: 19.04.2022
- Jacobsen B, Thies K, Altrock A, Förster C, König M, Baumgärtner W. (2007) Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. *Vet Microbiol.* 124, 353-57.
- Khudhair YI, Al-Husseiny SH, Jawad AA. (2020) Molecular detection and phylogenetic analysis of ovine herpesvirus-2 in sheep and goats of Al-Qadisiyah province, Iraq. *Bulg J Vet Med.* 4, 424-31
- Knowles DP. (2011) Herpesvirales. MacLachlan NJ. and Dubovi EJ. eds. *Fenner's Veterinary Virology.* Academic Press, London. p.179-201.

- Li H, Hua Y, Snowden G, Crawford TB. (2001) Levels of ovine herpesvirus 2 DNA in nasal secretions and blood of sheep: implications for transmission. *Vet Microbiol.* 79, 301-310.
- Li H, Karney G, O'Toole D, Crawford TB. (2008) Long distance spread of malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Can Vet J.* 49: 183-5.
- Li H, O'Toole D, Kim O, Oaks JL, Crawford TB. (2005) Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. *J Vet Diagn Invest.* 17, 171-175.
- Li H, Snowden G, O'toole D, Crawford TB. (1998) Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. *J Clin Microbiol.* 36, 223-226.
- Li H, Snowden G, O'toole D, Crawford TB. (2000) Transmission of ovine herpesvirus 2 among adult sheep. *Vet Microbiol.* 71, 27-35.
- Li H, Taus NS, Lewis GS, Kim O, Traul DL, Crawford TB. (2004) Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions the predominant mode for transmission. *J Clin Microbiol.* 42, 5558-5564.
- Neimanis AS, Hill JE, Jardine CM, Bollinger TK. (2009) Sheep-associated malignant catarrhal fever in free-ranging moose (*Alces alces*) in Saskatchewan, Canada. *J Wildl Dis.* 45, 213-217.
- O'Toole D, Li H, Sourk C, Montgomery DL, Crawford TB (2002). Malignant catarrhal fever in a bison feedlot, 1993-2000. *J Vet Diagn Invest.* 14, 183-193.
- O'Toole D, Li H. (2014) The Pathology of Malignant Catarrhal Fever, With an Emphasis on Ovine Herpesvirus 2. *Vet Pathol.* 51, 437-52.
- Otter A, Pow I, Reid HW. (2002) Outbreak of malignant catarrhal fever in Welsh Black cattle in Carmarthenshire. *Vet Rec.* 151, 321-324.
- Russell GC, Stewart JP, Haig DM. (2009) Malignant catarrhal fever: A review. *Vet J.* 179, 324-35.
- Schultheiss PC, Collins JK, Spraker TR, DeMartini JC. (2000) Epizootic malignant catarrhal fever in three bison herds: Differences from cattle and association with ovine herpesvirus-2. *J Vet Diagn Invest.* 12, 497-502.
- Sood R, Hemadri D, Bhatia S. (2013) Sheep associated malignant catarrhal fever: an emerging disease of bovids in India. *Indian J Virol.* 24, 321-331.
- Stahel ABJ, Baggenstos R, Engels M, Friess M, Ackermann M. (2013) Two different macaviruses, ovine herpesvirus-2 and caprine herpesvirus-2, behave differently in water buffaloes than in cattle or in their respective reservoir species. *PLoS ONE*, 8, 1-7.
- Twomey DF, Holt GJ, Reid HW. (2002) Malignant catarrhal fever in cattle with suspected bracken poisoning. *Vet Rec.* 151, 486-487.
- Vinod Kumar N, Sreedevi B, Karthik A, Lakshmi SV, Reddy AG, Sreenivasulu D. (2014) Detection of OvHV-2 from an outbreak of sheep associated malignant catarrhal fever from crossbred cattle of Southern India. *Vet Res Commun.* 38, 323-328.
- Wiyono A. (1999) The detection of ovine herpesvirus-2 in reservoir host of malignant catarrhal fever in Indonesia by means of polymerase chain reaction. *Indones J Anim Vet Sci.* 4, 121-7.
- Yazıcı Z, Arslan HH, Gumusova SO, Meral Y, Albayrak H. (2006) Occurrence of ovine herpesvirus type-2 infection in sheep and cattle in Samsun Province, Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 113, 348-350.
- Yeşilbağ K. (2007) Seroprevalance of malignant catarrhal fever-related gamma herpes viruses in domestic ruminants in Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 39, 363-368.
- Yıldırım Y, Dağalp SB, Yılmaz V, Majarashin ARF. (2012) Molecular characterisation of ovine herpesvirus type 2 in Turkey. *Acta Vet Hung.* 60, 521-527.



Isolation of SARS CoV-2 and evaluation of human-animal cases

Sabri Hacıoğlu^{1*}, Ahu Pakdemirli², Dilek Dülger³, Erdem Danyer⁴, Ümmü Sena Sarı⁵,
Özcan Yıldırım⁶, Cevdet Yarıllı⁷

^{1,4,6,7} Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Türkiye

² Gülhane School of Medicine, Department of Physiology, University of Health Sciences, Ankara, Türkiye

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Karabük, Karabük, Türkiye

⁵ Ankara 29 Mayıs State Hospital, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 06.05.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 27.05.2022

Abstract: Complete genome analyses of SARS CoV-2 isolated from three Turkish patients are compared with other complete genome sequences in the world. In this study, especially the sequence data from animals were also involved in the evaluation. When the genetic data collected from animal and human COVID-19 cases were analyzed, it was evaluated that some recent nucleotide changes in human cases were similar to those of some animal COVID-19 cases. It is recommended that nucleotide or protein changes in human cases in SARS CoV-2 be followed and compared with large-scale studies in animals.

Keywords: SARS CoV-2, Turkey, Animal, COVID-19, Veterinary

SARS CoV-2 izolasyonu ve insan hayvan vakalarının değerlendirilmesi

Özet: Üç hastadan izole edilen SARS CoV-2'nin tam genom analizleri dünyadaki diğer tam genom dizileriyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada özellikle hayvanlardan alınan dizilim verileri de değerlendirmeye dahil edilmiştir. Hayvan ve insan COVID-19 vakalarından toplanan genetik veriler analiz edildiğinde, insan vakalarında yakın zamanda meydana gelen bazı nükleotid değişikliklerinin bazı hayvan COVID-19 vakalarındaki benzer olduğu değerlendirildi. SARS CoV-2'de insan vakalarındaki nükleotid veya protein değişikliklerinin hayvanlarda yapılacak geniş çaplı çalışmalarla takip edilerek karşılaştırılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: SARS CoV-2, Türkiye, COVID-19, Hayvan, Veteriner

Introduction

The COVID-19 outbreak has now reached over 510 million confirmed cases and 6,2 million confirmed deaths worldwide since 2019 (WHO 2022).

Coronaviruses belong to the *Orthocoronavirinae* subfamily of the *Coronaviridae* family in the order *Nidovirales* (Gorbalenya et al. 2020). There are four genera in the subfamily: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) are important human pathogens in betacoronaviruses (Park 2020). According to genome sequencing, SARS-CoV-2 is a new member of betacoronaviruses (Zhu et al. 2020).

The symptoms of COVID-19 are like respiratory illnesses caused by respiratoric viruses such as other coronaviruses and influenza viruses. So, these dis-

eases are mostly confused with each other. While the most common symptoms of COVID-19 are fever, dry cough, tiredness, diarrhea, muscle or body aches and pains, conjunctivitis, loss of taste or smell, and headache, more serious symptoms are difficulty in breathing or shortness of breath, chest pain or pressure, inability to wake up or stay awake, bluish lips or face (Rabaan et al. 2020; CDC 2020).

After the first SARS CoV-2 cases, researchers started to investigate SARS CoV-2 to find out its source. To date, there is not enough evidence about the source of SARS CoV-2. On the other hand, genetic sequence data of *Rhinolophus* (horseshoe bat) and pangolin coronaviruses are closely related to SARS CoV-2 in human cases. Scientists are carrying out studies about SARS CoV-2 to find the original route of transmission to humans (OIE 2021; Lam et al. 2020).

Yazışma adresi / Correspondence: Sabri Hacıoğlu, Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Türkiye
e-mail: sabri.hacioglu@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: *0000-0002-5493-0807 • *0000-0001-9224-3007 • *0000-0003-3640-5686
• *0000-0002-7922-7384 • *0000-0002-6665-5523 • *0000-0002-1113-6136 • *0000-0002-0391-9456

According to the World Organisation for Animal Health (OIE 2020) ferrets, American mink (*Neovison vison*), racoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*), domestic cats, large cats (tigers, lions and puma), Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*) and Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) could transmit SARS CoV-2 between their populations. Only American minks could transmit SARS CoV-2 to humans (OIE 2020). Ferrets, American minks, dogs, domestic and large cats could show clinical signs. A lot of countries have been affected by the morbidity and mortality of SARS CoV-2 disease in mink farms. SARS CoV-2 incubation period and symptoms seem similar in animals and humans but more studies required to clarify (OIE 2021; OIE 2020)

Transgenic mice, Rhesus macaques, juvenile cats, ferrets and rabbits show similar SARS CoV-2 lesions or histopathological findings like humans such as interstitial pneumonia, inflammatory cell infiltration around the bronchioles and blood vessels, massive lesions in the nasal and tracheal mucosa epithelia and lungs (OIE 2020; Cohen 2020; Schlottau et al. 2020).

SARS CoV-2 infected people should stay in quarantine during their illness to prevent the transmission to other people. Similarly, people should implement the same restriction conditions for mammalian animals, including pets (OIE 2020; OIE 2021).

SARS CoV-2 complete genome analyses isolated from three Turkish patients are compared to other complete genome sequences from around the world. In this study, the sequence data from animals, in particular, were evaluated. When genetic data from animal and human COVID-19 cases was analyzed, it was discovered that some recent nucleotide changes in human cases were similar to those in animal COVID-19 cases.

Material and Method

Real Time RT-PCR

For the isolation of SARS CoV-2, RNA extraction (QIAamp cadior Pathogen Mini Kit) was performed from the swab samples collected from the respiratory tract of eight people treated with the diagnosis of SARS CoV-2 in 29 Mayıs State Hospital affiliated to the Ministry of Health of Turkey. SARS CoV-2 test was performed by Real Time RT-PCR method on Biorad CFX-96 device using primary sequences recommended by the World Health Organization

(Corman et al. 2020) and QuantiNova Pathogen + IC Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Only three samples were found positive in the tests. Positive samples were cultivated into Vero E6 cell culture using the adsorption method.

Virus Culture

Vero E6 cells seeded in 25 cm³ cell culture flasks were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma, United States). Samples were filtered from 0.22 µm syringe filters (Merck, Germany) every time before inoculating to cell culture and incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂. The inoculum was then removed and replaced with fresh DMEM. After incubation, cells were observed every day for the presence of a cytopathic effect (CPE) under the microscope, and culture supernatants were harvested, aliquoted, and stored at -80°C.

Afterwards, inoculation and nucleic acid extraction procedures were applied to the cell culture again. Real Time RT-PCR test was applied to the extractions as stated above. In this way, 3-5 passages were made and the samples that were cultivated each time were confirmed to be positive. Samples with codes ETLKVET1, ETLKVET2 and ETLKVET3 were isolated. It was transferred to the next stage for full genome analysis.

MinION Sequencing

Sequencing steps and Bioinformatic data were prepared by a company named Nucleus Genetics (İzmir, Turkey). Library preparation for the MinION sequencing was performed using the Ligation Sequencing kit SQK-LSK109 and Natives Barcoding based on the manufacturer's instructions and modifications.

MinION Bioinformatics Workflow

nCoV-19 Genome Analyzer was used for SARS CoV-2 genome analyzing. Selected reads were mapped against SARS-CoV-2 reference (NC_045512) using Minimap2 (v2.9) (Li 2018). SAMtools (v1.9) were used to sort the aligned BAM files to obtain coverage data and a consensus sequence. Alignment statistics were also calculated with SAMtools.

Phylogenetic analyses

In order to perform whole genome analysis, 126 full genome data of SARS CoV-2 were acquired from GSIAD and GenBank. While selecting human samples, priority was given to having samples from

every continent and the countries that have most cases in the continents. All full genome SARS CoV-2 data we encounter in animals in two databases were selected. Our three samples (ETLKVET1, ETLKVET2 and ETLKVET3) were added to these samples.

Total of 129 full genome SARS CoV-2 sequences were aligned using the ClustalW (Larkin et al. 2007) algorithm.

Phylogenetic analysis was performed based on the maximum likelihood (ML) criteria by using MEGA X (Kumar et al. 2018), MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck 2003), RAxML (Stamatakis 2014), IQ-TREE (Nguyen et al. 2015), PHYLIP (Felsenstein 2005) and PAUP 4.0 (Swofford 2003) programs and the accuracies of the trees were checked. Similar trees were acquired in all the programs used.

Subsequent models were developed that incorporate differences for all relative rates to the general time reversible gamma model (GTR+G model). By GTR + G method, 1000 bootstrap was made to find the most suitable tree in MEGAX, RAxML, PAUP 4.0 and IQ-TREE programs.

In the MrBayes program, using by the GTR + G method with Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis, the most suitable tree was found by performing bootstrap in 2 different channels until the cluster value was below 0.001. 14 million MCMC chain iterations were sampled every 100 generations, corresponding to 22 000 trees for SARS CoV-2 spike nucleotide analyses. 5 million MCMC chain iterations were sampled every 100 generations, corresponding to 50 000 trees for SARS CoV-2 full genome nucleotide analyses. In MCMC analyses, the mixture of samples was controlled with Tracer 1.3 (Rambaut et al. 2018).

The data from the programs were arranged using Figtree 1.4.3 (Rambaut 2009) and Dendroscope 3 (Huson and Scornavacca 2012) softwares.

Results

Virus growth was observed in three of the eight specimens inoculated in cell culture. It was checked daily in terms of CPE.

PHYLIP, MEGA X, RAxML, MrBayes, PAUP 4.0a168, IQTREE programs were used to verify the reliability of phylogenetic trees. Since the results acquired in all programs were close to each other, the trees were interpreted to be reliable.

Nucleotide and amino acid changes were examined by downloading the SARS CoV-2 full genome data acquired from animals and randomly selected people from each continent in GenBank and GSIAD.

Nucleotide and amino acid changes (Orf, Spike) varied by 1-0.5%.

Full genome analysis

When the tree created using the full genome was examined, it was seen that although most of SARS CoV-2 sequences acquired from animals formed a group, some of them were intertwined with those obtained from humans (Figure 1).

It was seen that our ETLKVET2 coded sample was in the same branch with Turkey ACUTG-2, Saudi Arabia 29903 and Saudi Arabia KAUST samples.

When ETLKVET1 and ETLKVET3 were evaluated in general, it was seen that they were closely related to SARS CoV-2 detected in many countries.

Comparing the data acquired from animals and humans, it was seen that USA feline MT425184 detected in cats in USA and MT259226 detected in human in China were in the same branch.

KUMCO1 detected in human in South Korea and those detected in *Panthera leo* in USA (MT704312, MT704311, MT704310, MT747978, NY 041520, MT425183) are in the same branch with the coded sequence as MT215193 detected in dog in Hong Kong. However, sequences detected from canine and feline species were also found in the same branch (Figure 1).

The mutated SARS CoV-2 detected in England in December 2020 are in the same branch with sequences detected in *Felis catus* (MT709104, MT709105) in France, sequences detected in many minks in Denmark and GLAB-cov217 identified from Turkey. These mutated SARS CoV-2 were detected in minks between May and November and it was detected before human cases.

Although SARS CoV-2 sequences found in mink in the Netherlands formed a group within themselves, Tygerberg 07 2020 and Nigeria ED32 CV164 sequences acquired from people from South Africa and Nigeria also joined this group.

The sequences detected in *Panthera tigris* in USA (tiger NY P3, MT704314, MT704315, MT704316, tiger NY 4, MT704317, MT704313, MT365033), and sequences detected in humans and named as Australia VIC1658, New Zealand 29782 and Georgia Tb 7856 were detected in the same branch (Figure 1).

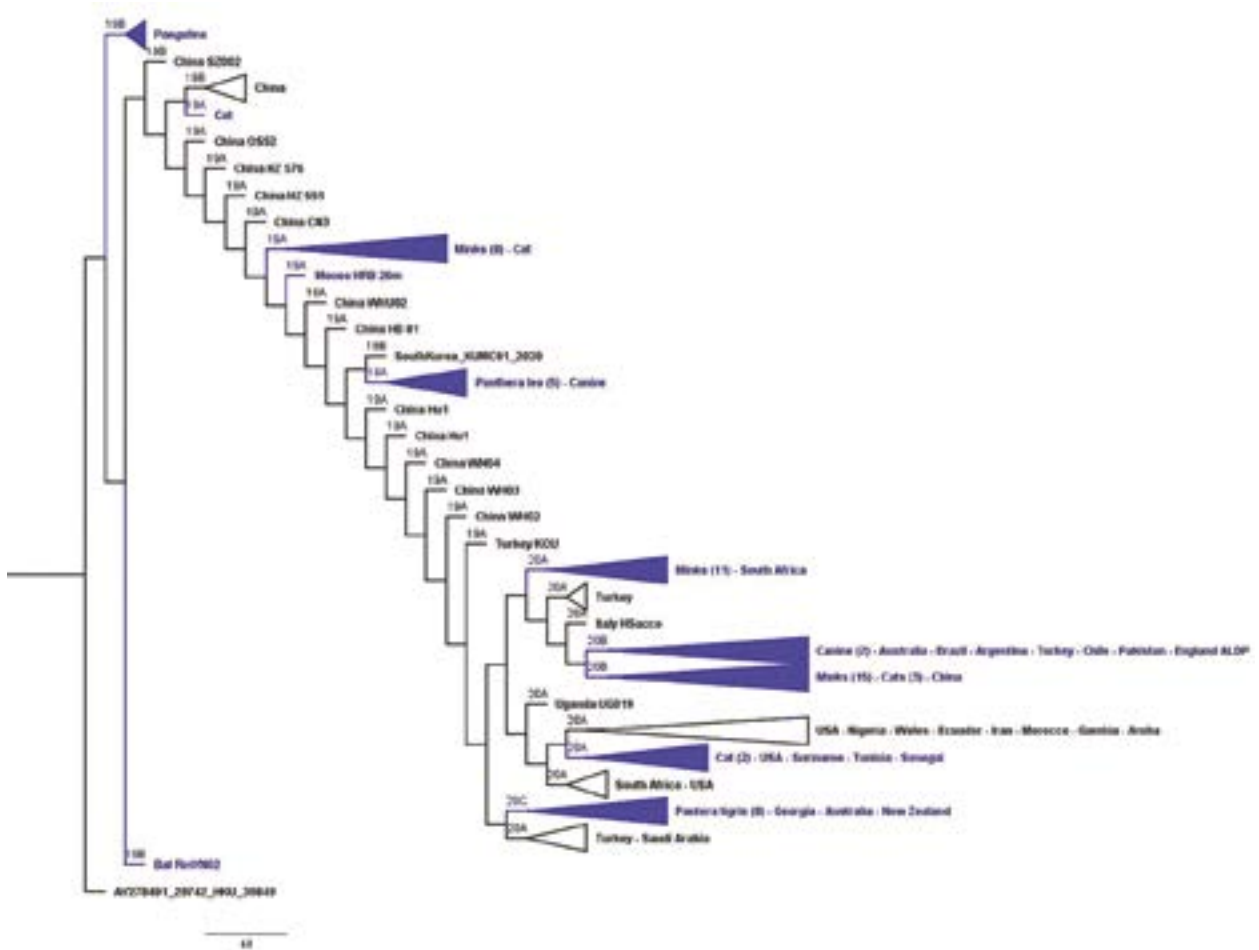


Figure 1. Phylogenetic analysis of full genome of SARS CoV-2. Blue coloured branches indicated SARS CoV-2 sequences from animals and colourless branches indicated SARS CoV-2 sequences from humans. Genetic clades of SARS CoV-2 were shown on the branches

Trees were also created for protein-coding regions. Other than spike, no significant difference was found. The tree created for the spike is presented in detail due to its roles in antibody response and virus entry into the cell (Figure 2). In trees made of both full genome and spike protein, SARS CoV-2 detected in human, canine, mink, leopard, tiger and mouse, except for SARS CoV-2 detected in bats and pangolins in Wuhan, were found in a single main branch. The findings acquired from this tree are as follows;

Turkey ETLKVET1 and ETLKVET2 (April 2020) sequences were closely related to Denmark mink MT919536 (June 2020) and Belgium *Felis catus* MT747438 (March 2020) sequences. ETLKVET3 was first found close to Ukraine 203100352 and then to SARS CoV-2 detections in many countries.

It was seen that human samples with codes Gambia NPHL 2374 (May 2020), USA WT UW 535 (June 2020), New Zealand 29782 (May 2020) and Georgia 7856 (May 2020) were closely related to the canine Hong Kong 29764 (March 2020), USA *Panthera tigris* MT704313 and MT365033 (April 2020), Denmark mink MT919535 (June 2020) and MT99531, and France *Felis catus* MT709105 (May 2020). It was seen that these tree branches have close relationship with SARS CoV-2 sequences acquired from animals (mink DK AL3, *Felis catus* FRA and tiger NY 040420). Again, in another branch, Belgium cat MG0320 (2020 March), France *Felis catus* MT709104 (May 2020) seemed closely related to Saudi Arabia 29903 (May 2020), China Zhejiang SX0715 (July 2020) and Turkey KOU MG (May 2020).

USA *Panthera tigris* MT704317 (April 2020) and France cat Env Di 483064 (May 2020) with USA Tx

HM0306 (March 2020), Uganda UG019 (April 2020), Wales PHWC 36C94 (April 2020) and Italian env LOM INMI HSacco (April 2020) seemed to be closely related.

It was seen that the genetic data detected in the canine (MT215193) at the beginning of the epidemic in Hong Kong and in China were also close to each other.

England ALDP C4812B coded sequence which was first detected in the UK in December 2020 was in the same branch with tiger USA NY (April 2020) and *Panthera tigris* MT704316 (April 2020). Examination results of the tree obtained in terms of spike protein were also evaluated in this way.

In the table obtained from the nucleotide changes (Table 1), it is seen that the sequences belonging to animals form 3 groups different from those of humans. These are formed by the sam-

ples of Georgia, Australia, New Zealand along with minks, *Panthera leo* and *Panthera tigris*.

Although many nucleotide changes are seen in different samples in the genetic sequence of SARS CoV-2, most of them do not change the amino acid synthesis.

Among the sequences evaluated, there are 7 amino acid changes seen only in mink. Likewise, only 7 amino acid changes were seen in *Panthera leo* group different from the others. There are human data available from three other countries with *Panthera tigris*. In this group, 2 amino acid changes were also observed. Unlike other groups, the changes seen in animals here were also detected in humans.

The data obtained from animals in trees are marked in red and it is seen that these are concentrated on certain branches.

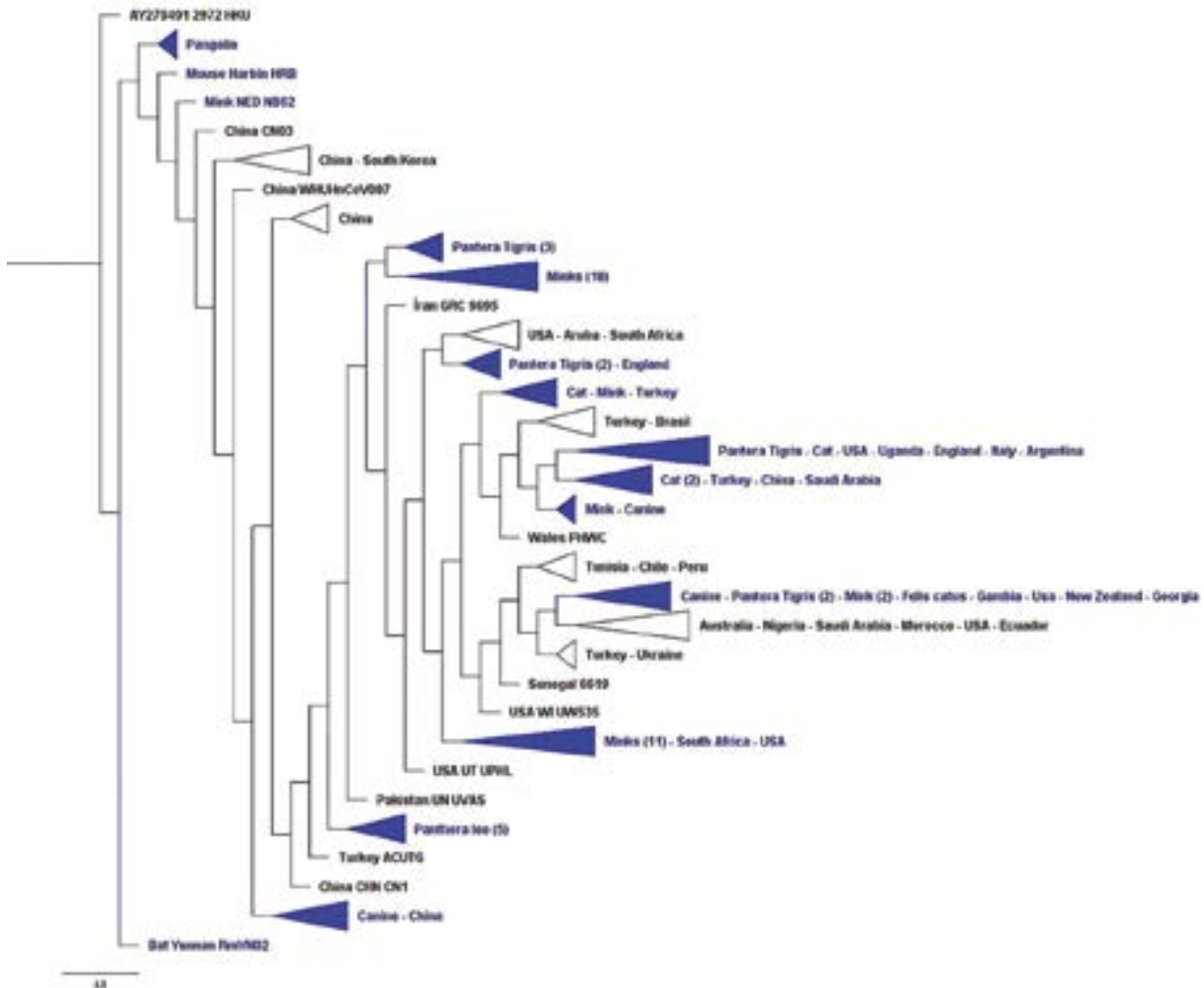


Figure 2. Phylogenetic analysis of full length Spike gene of SARS CoV-2. Blue coloured branches indicated SARS CoV-2 sequences from animals and colourless branches indicated SARS CoV-2 sequences from humans

Nucleotide	Region/ Aminocid number	NC_045512		Mink samples (N:34)			Panthera leo*		Panthera tigris** + Georgia, Australia, New zeland		Human+ Animal***		England ALDP C4812B	
		nuc	aa	nuc	aa	n	nuc	aa	nuc	aa	nuc	aa	nuc	aa
241	-	C		T		26					T		T	
514	-	T		C		8								
913		C											T	
1059	ORF1A/ 265	G	T						T	I				
1380	ORF1A/372	C	A	T	V	11								
1478	ORF1A/405	G	A	A	T	3								
1605-1606-1607	ORF1A/447-448	ATG	ND	XXX	XX	8								
3037	-	C		T		26	C				T		T	
3251	ORF1A/996	G	D	T	Y	4								
3267	ORF1A/1001	C	T										T	I
4206	ORF1A/1314	C	A										T	V
5388	ORF1A/1708	C	A										A	V
5986		C											T	
6954	ORF1A/2230	T	I										C	T
7843		C					T							
8266		C					T							
10829		A		G		5								
11083		G					T							
12795		G		A		13								
13768	ORF1A/4502	A	M				G	V						
14274		G		A		11								
14408	ORF1A/4715	C	P	T	L	26					T	L	T	P
14676		C											T	
14805		C					T							
15279		C											T	
15656	ORF1A/5131	C	T	T	I	15								
15869	ORF1A/5202	A	H				T	L						
16176		T											C	
17247		T					C							
17410	ORF1A/5716	C	R	T	C	8								
17639	ORF1A/5792	C	S				T	L						
18171		C					T							
22344	S/261	G		A	D	4								
22920	S/453	A	Y	T	F	18								
23063	S/501	A	N										T	Y
23064	S/501	A	N	C	T	2								
23075	S/505	T	Y				C	H						

Nucleotide	Region/ Aminocid number	NC_045512		Mink samples (N:34)			Panthera leo*		Panthera tigris** + Georgia, Australia, New zeland		Human+ Animal***		England ALDP C4812B	
		nuc	aa	nuc	aa	n	nuc	aa	nuc	aa	nuc	aa	nuc	aa
23271	S/570	C	A										A	D
23400	S/613	A	Q				G (2)	R (2)						
23403	S/614	A	D	G	G	26					G	G	G	G
23429-23430	S/623	GC					AT AC	I (3) T(2)						
23604	S/681	C	P										A	H
23709	S/716	C	T										T	I
24506	S/982	T	S										G	A
24862		A		G		11 ^a								
24914	S/1118	G	D										C	H
25563	ORF3A/ 57	G	Q						T ^b	H				
25936	ORF3A/182	C	H	T	Y	19								
26144	ORF3A/251	G	G				T ^c	V						
27972		C											T	
28048		G											T	
28111		A											G	
28280-81-82	N/3	GAT	D										CTA	L
28881-28882-28883	N/203-204	GGG	RG	AAC ^d	KR	15	GGG				AAC	KR	AAC	KR
28915		C					T							
28977	N/235	C	S										T	F
29685		T		C		5								

Table 1. Nucleotide and amino acid substations in the selected SARS CoV-2 sequences. (a southafrica464118; b ETLKVET2+ TUR ACUTG-2 + SaudiArabia_ MADINAH1060+ Saudi_Arabia_JEDDAH722; c 215193 gb_MT215193_1_canine_HKG_20-02756_2020_ canine; SouthKorea_KUMC01_2020; d gb_MT709105_1_Felis_catus_FRA_Env-Di_2; gb_MT709104_1_Felis_catus_FRA_Env-Ba_2; gb_MT270814_1_canine_HKG_20-03695_2020; canine_Hong_1_29764_Kong_20_03695_2020_EPI_ISL_450403_2020_03)

Discussion and Conclusion

Due to the rapid circulation of SARS CoV-2 in the world, similar SARS CoV-2 sequences can be found in many countries. Therefore, more data from different species are needed to confirm the origin studies of the SARS CoV-2. The proximity and relationship of SARS CoV-2 circulating between humans and those circulating in animals may also shed light on the future risks of the SARS CoV-2.

Sequences belonging to full genome data of ETLKVET1, ETLKVET2 and ETLKVET3 were generally found to be close to sequences in other countries. The data obtained here also show that the SARS

CoV-2 is spreading rapidly to all countries (Adam et al. 2020; Lemieux et al. 2020).

Since there are similar changes in different living species at different times, it seems that SARS CoV-2 can circulate in different species without serious mutation (OIE 2021; El Masry et al. 2020).

When the nucleotide and amino acid sequences of our 3 samples were compared with other SARS CoV-2 samples results, it was observed that there were changes in amino acid sequence of ETLKVET2 (ORF3A/ 57, ORF1A/5809, ORF1A/5584). When looking at its place in phylogenetic trees, it can be evaluated that it is close to the sequences acquired

from Georgia, New Zealand, Australia and Saudi Arabia, *Panthera tigris*, minks and cats.

When the genetic evaluations on SARS CoV-2 are examined, it is seen that there are many different classifications (Rambaut et al. 2020). Different criteria were evaluated in these classifications and the reliability of the obtained trees was verified with different programs. Since SARS CoV-2 detected in human, canine, mink, leopard, tiger and mouse are found in a single main branch except in bats and pangolins in Wuhan, it is seen that a single genetic type circulates by infecting different species all over the world. It is seen in the data that SARS CoV-2 can circulate in more than one species without serious mutations. However, when the SARS CoV-2 genetic data used in these studies are examined, it is seen that there are small nucleotide and amino acid changes. These nucleotide and amino acid changes (in ORF and Spike proteins) vary by 1-0.5%.

According to the phylogenetic tree data obtained, SARS CoV-2 originates from a branch containing pangolins and RaT13 bat. These findings are consistent with the data described before (Li et al. 2020; Andersen et al. 2020; El Masry et al. 2020).

Although many nucleotide changes are seen in different samples in the genetic sequence of the SARS CoV-2, most of them do not change the amino acid synthesis (Handrick et al. 2020; Gunadi et al. 2020). Therefore, some nucleotide changes may not directly affect the pathogenicity of SARS CoV-2, however, after evaluating where these proteins play a role in SARS CoV-2 with amino acid changes, definite conclusions can be reached.

SARS CoV-2 detections in carnivores in the USA and in people from different countries indicates that they have common mutations. Similar changes seen in these animals in the USA were found in humans in the following months. It is recommended to investigate in which organisms SARS CoV-2 survives in nature, its reservoirs or winter mechanism in the following days.

In addition to England, the sequences (Tygerberg, 464118) obtained from South Africa in April 2020 are similar with the sequences acquired from many minks (in April-November 2020).

SARS CoV-2 detected in Turkey is intertwined with other countries, which shows how fast SARS CoV-2 can spread in the globalizing world. For this reason, countries must act jointly by preparing a common strategy in the fight against human or animal diseases in the future.

This publication reviews SARS CoV-2 genetic data from animals and humans. It has been observed that the genetic data obtained from many animals form a common branch and some of them are located in these branches together with obtained from humans.

In conclusion, it is thought that it will be faster to illuminate the dark points about the spread or treatment of diseases by jointly conducting disease studies in humans and animals within the One Health approach.

Acknowledgements: We would like to express our sincere gratitude to Dr. Bekir Pakdemirli for his encouragement and support.

Funding: This work was supported by funding from the Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry General Directorate of Agricultural Research and Policies, Project No: TAGEM/HSYGAD/G/20/A5/P6/01.

Data Availability: Viral genome sequences are available under Genbank accession numbers MW306666- MW306668; under GISAID accession numbers EPI_ISL_636969- 636971.

Compliance with ethical standards: University of Health Science, Non Interventional Scientific Research Ethics Committee decision number 2020-151

References

- Adam DC, Wu P, Wong JY, Lau EHY, Tsang TK, Cauchemez S, Leung GM and Cowling BJ (2020) Clustering and superspreading potential of SARS-CoV-2 infections in Hong Kong. *Nat. Med.* 26, 1714–1719. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-1092-0>.
- Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC and Garry RF (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 26, 450–452. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
- Cdc (2020) Symptoms of Coronavirus (COVID-19) Know the symptoms of COVID-19, which can include the following. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> [Accessed May 4, 2022].
- Cohen J (2020) From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers. *Science* (80-.). 368, 221–222. Available at: <http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/8/326/326ra21.full>.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, Haagmans BL, Van Der Veer B, Van Den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MPG and Drosten C (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 25. Available at: [/pmc/articles/PMC6988269/](https://pmc/articles/PMC6988269/).
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, Haagmans BL, Lauber C, Leontovich AM,

- Neuman BW, Penzar D, Perlman S, Poon LLM, Samborskiy D V., Sidorov IA, Sola I and Ziebuhr J (2020) The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Gunadi, Wibawa H, Marcellus, Hakim MS, Daniwijaya EW, Rizki LP, Supriyati E, Nugrahaningsih DAA, Afiahayati, Siswanto, Iskandar K, Anggorowati N, Kalim AS, Puspitarani DA, Athollah K, Arguni E, Nuryastuti T and Wibawa T (2020) Full-length genome characterization and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 virus strains from Yogyakarta and Central Java, Indonesia. *PeerJ* 8, 1–15.
- Handrick S, Bestehorn-Willmann M, Eckstein S, Walter MC, Antwerpen MH, Naija H, Stoecker K, Wölfel R and Ben Moussa M (2020) Whole genome sequencing and phylogenetic classification of Tunisian SARS-CoV-2 strains from patients of the Military Hospital in Tunis. *Virus Genes* 56, 767–771. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01795-9>.
- Huson DH and Scornavacca C (2012) Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* 61, 1061–1067. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22780991/>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Nkay C and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722887/>.
- Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, Tong YG, Shi YX, Ni XB, Liao YS, Li WJ, Jiang BG, Wei W, Yuan TT, Zheng K, Cui XM, Li J, Pei GQ, Qiang X, Cheung WYM, Li LF, Sun FF, Qin S, Huang JC, Leung GM, Holmes EC, Hu YL, Guan Y and Cao WC (2020) Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 583, 282–285.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17846036/>.
- Lemieux JE, Siddle KJ, Shaw BM, Loreth C, Schaffner SF, Gladden-Young A, Adams G, Fink T, Tomkins-Tinch CH, Krasilnikova LA, DeRuff KC, Rudy M, Bauer MR, Lagerborg KA, Normandin E, Chapman SB, Reilly SK, Anahtar MN, Lin AE, Carter A, Myhrvold C, Kembal ME, Chaluvadi S, Cusick C, Flowers K, Neumann A, Cerrato F, Farhat M, Slater D, Harris JB, Branda JA, Hooper D, Gaeta JM, Baggett TP, O'Connell J, Gnirke A, Lieberman TD, Philippakis A, Burns M, Brown CM, Luban J, Ryan ET, Turbett SE, LaRocque RC, Hanage WP, Gallagher GR, Madoff LC, Smole S, Pierce VM, Rosenberg E, Sabeti PC, Park DJ and MacInnis BL (2020) Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 in Boston highlights the impact of superspreading events. *Science* (80-.). 371, eabe3261. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abe3261>.
- Li H (2018) Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 34, 3094–3100. Available at: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/34/18/3094/4994778>.
- Li T, Liu D, Yang Y, Guo J, Feng Y, Zhang X, Cheng S and Feng J (2020) Phylogenetic supertree reveals detailed evolution of SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* 10, 1–10.
- El Masry, I., von Dobschuetsch, s., plee, L., Larfaoui, F., Yang, Z., song, J., pfeiffer, D., calvin, s., roberts, H., Lorusso, a., Barton-Behravesh, c., Zheng, Z., Kalpravidh, W. & sumption K (2020) *Exposure of humans or animals to SARS-CoV-2 from wild, livestock, companion and aquatic animals*, FAO. Available at: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cb1739en>.
- Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A and Minh BQ (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. Available at: <https://pmc/articles/PMC4271533/>.
- OIE (2021) Events in animals: OIE - World Organisation for Animal Health. Available at: <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019-novel-coronavirus/events-in-animals/>.
- OIE (2020) Infection With Sars-Cov-2 in Animals - Oie Last Update in September 2020. 2, 1–6.
- Park SE (2020) Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clin Exp Pediatr* 63, 119–124.
- Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Singh Malik Y, Dhama K, Iqbal Yatoo M, Katterine Bonilla-Aldana D and Rodriguez-Morales AJ (2020) SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Infez Med* 2, 174–184.
- Rambaut A (2009) FigTree, version 1.4.3. *Comput. Progr. Distrib. by author, website* <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G and Suchard MA (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–904. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29718447/>.
- Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L and Pybus OG (2020) A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 5, 1403–1407. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. Available at: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btg180>.
- Schlottau K, Rissmann M, Graaf A, Schön J, Sehl J, Wylezich C, Höper D, Mettenleiter TC, Balkema-Buschmann A, Harder T, Grund C, Hoffmann D, Breithaupt A and Beer M (2020) SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet Microbe* 1, e218–e225. Available at: www.thelancet.com/microbe.
- Stamatakis A (2014) RAXML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. Available at: <https://pmc/articles/PMC3998144/>.
- Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- WHO (202AD) WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. *Who.int*, 1. Available at: <https://covid19.who.int/> [Accessed February 12, 2021].
- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F and Shi Z-L (2012) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1212-7>.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF and Tan W (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. Available at: <https://pmc/articles/PMC7092803/>.



Protective effect of silymarin and boric acid against isoproterenol-induced myocardial infarction in mice

Yaşar Şahin^{1*}, Mehmet Eray Alçıgır², Filiz Bakar Ateş³, Hüsamettin Ekici⁴, Ali Şenol⁵,
Enes Gazi Atıcı⁶, Ebru Yıldırım⁷, Siyami Karahan⁸

^{1,4,7} Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Türkiye.

² Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Türkiye.

³ Department of Biochemistry, Faculty of Chemists, Ankara University, Ankara, Türkiye.

⁵ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Türkiye.

⁶ Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Türkiye.

⁸ Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 25.03.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 28.04.2022

Abstract: This study aimed to compare the protective effects of separate and combined use of silymarin and boric acid against myocardial infarction induced by isoproterenol. Distilled water was given orally by gavage to the GI and GII groups for fourteen days. The GIII group was received silymarin (100 mg/kg), while the GIV group was given boric acid (100 mg/kg) for 14 days. In the last group, both silymarin and boric acid were given orally (gavage) for fourteen days. On the thirteenth and fourteenth days of the study, while isotonic water was applied to the GI group, isoproterenol (85 mg/kg) was applied to the other groups subcutaneously. Plasma ALT, AST, Ca, CK, CHO, TP, Ing P, IL-6, IL-12, PAL-1, and sPLA2 parameters were evaluated. Histopathological examination was performed on the heart, lung, liver, kidney, spleen, cerebrum, and cerebellum tissues taken from mice. The CK level was found to be significantly lower in the GIII and GV groups compared to the GII group ($P<0.05$). As a result, the increases shown in the plasma AST and CK activities caused due to the myocardial damage induced by isoproterenol were decreased in the silymarin and boric acid applied groups. Therefore it was thought that silymarin and boric acid may contribute to protection against myocardial infarction.

Keywords: Boric acid, Creatinine kinase, Isoproterenol, Myocardial infarction, Silymarin.

Farelerde izoproterenol ile indüklenmiş miyokard infarktüsüne karşı silimarin ve borik asidin koruyucu etkisi

Özet: Bu çalışmada izoproterenol ile oluşturulan miyokard infarktüsüne karşı silimarin ve borik asidin ayrı ve kombine kullanımlarının koruyucu etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. GI ve GII gruplarına on dört gün boyunca gavaj ile oral yolla distile su verildi. On dört gün boyunca; GIII grubuna silimarin (100 mg/kg) verilirken GIV grubuna borik asit (100 mg/kg) verildi. Son gruba ise hem silimarin hem de borik asit on dört gün boyunca oral yolla (gavaj) verildi. Çalışmanın on üçüncü ve on dördüncü günü intraperitoneal yolla; GI grubuna izotonik uygulanırken, diğer gruplara subkutan izoproterenol (85 mg/kg) uygulandı. Plazmadan; ALT, AST, Ca, CK, CHO, TP, Ing P, IL-6, IL-12, PAL-1 ve sPLA2 parametreleri değerlendirildi. Farelerden alınan kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, cerebrum ve cerebellum dokularında histopatolojik inceleme yapıldı. CK düzeyi GII grubuna göre GIII grubunda anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($P<0.05$). Sonuç olarak izoproterenolün sebep olduğu miyokardiyal hasar sonucunda AST ve CK düzeylerinde artışlarına karşı silimarin ve borik asit uygulanan gruplarda azalmalar görüldü. Bu özelliklerinden dolayı, silimarin ve borik asitin; miyokard enfarktüs durumlarına karşı korumaya katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Borik asit, İzoproterenol, Kreatin kinaz, Miyokard enfarktüsü, Silimarin

Introduction

Myocardial infarction is one of the most important causes of death among cardiovascular diseases (Pollard 2000). Generally, the cause of myocardial infarction is the cessation or reduction of blood flow as a result of occlusion of the vessels in a certain part of the heart resulting in necrosis in the cells (Lu

et al. 2015, Saleh and Ambrose 2018). Many factors such as genetics, obesity, diabetes, and irregular nutrition trigger this disease (Lu et al. 2015).

Silymarin has been long used in traditional medicine, and extracted from the plant *Silybum marianum* (L.) Gaertn. It consists of many flavonolignans such as silybin A-B, and has multiple effects such

Yazışma adresi / Correspondence: Yaşar Şahin, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Türkiye e-mail: yasarsahin@kku.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-5936-4210 • ²0000-0002-5165-5854 • ³0000-0003-2809-8946

• ⁴0000-0001-6403-737X • ⁵0000-0003-4080-7776 • ⁶0000-0001-8311-2523 • ⁷0000-0002-6289-0729 • ⁸0000-0002-2744-1717

as anti-inflammatory and antioxidant (Chambers et al. 2017, MacDonald-Ramos et al. 2021). Although silymarin has been investigated in organ toxicity such as cardiotoxicity and hepatotoxicity, there is not enough data on its effectiveness. For this reason, it is necessary to obtain data with a large scale of studies (Vahabzadeh et al. 2018).

Boron is an important element present in soil, rock, drinking water and plants, and is generally found in the body as boric acid (Murray 1998, Devirian and Volpe 2003, Uluisik et al. 2018, Karimkhani et al. 2020). Boron affects the activity of many metabolic enzymes and cell membranes in humans and animals, and in case of its deficiency, many negative conditions such as a decrease in steroid hormone level and brain functions, growth and development disorders can occur (Devirian and Volpe 2003, Uluisik et al. 2018). In general, although the effects of boron on animals and humans are limited, new studies should be conducted to clarify its positive or negative effects (Uluisik et al. 2018).

Myocardial infarction cases, which are increasing worldwide due to clinical complications, are one of the most important global health problems. Medical difficulties in the treatment of these myocardial infarction cases have led to new searches. For this reason, the demands for preventive or curative herbal medicines and/or supplements containing elements are increasing. In this study, the protective effects of silymarin and/or boric acid against isoproterenol-induced myocardial infarction were investigated.

Material and Method

Animal experimental protocol

Fifty male Balb/c mice (6-8 weeks old) with an average weight of 30 ± 5 g were used in the study. Animals were randomly selected and divided into 5 groups of 10 Balb/c mice each. The first group (GI) was the control group and received sterile distilled water orally via gavage for fourteen days, and physiological isotonic saline was administered subcutaneously in the same amount on the 13th and 14th days of the study. The second group (GII) received sterile distilled water for 14 days via gavage. The third group (GIII) was given silymarin (100 mg/kg, Sigma, Germany) via gavage for 14 days (Papackova et al. 2018). The fourth group (GIV) was given boric acid (100 mg/kg, Merck, Germany) orally for 14 days by gavage (Karimkhani et al. 2020). The last group (GV) was given oral silymarin (100 mg/kg) and boric acid (100 mg/kg) for fourteen days. Ex-

cept for the first group, all groups received 85 mg/kg isoproterenol subcutaneously on the thirteenth and fourteenth days (Zhou and Ma 2020). Blood was collected from mice under anesthesia [xylazine 10 mg/kg ip. (Xylazinbio 2%®, Bioveta, Czech Republic), ketamine 90 mg/kg ip. (Vetaketam®, Vetagro, Poland)] 24 hours after isoproterenol administration. After blood collection, animals were sacrificed, hearts were taken, and histopathological examinations were made.

Sample collection and biochemical analysis

The blood taken from Balb/c mice was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at $+4^{\circ}\text{C}$ and their plasma was separated. Plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activities, creatine kinase (CK), calcium (Ca), cholesterol (CHO), inorganic phosphate (Ing P) (Teco diagnostic, USA), and total protein (TP) (Spinreact, Spain) levels were determined in a spectrophotometer device (Thermo Scientific Multiskan Go, Finland) with commercial test kits.

ELISA measurements

Plasma interleukin-6 (IL-6) levels were determined by a commercially available ELISA kit (FineTest, China). The sensitivity of the assay was defined as 2.813 pg/ml and the detection range was between 4.68-300 pg/ml. The coefficient of variation (CV) for the intraassay and interassay were $<8\%$ and $<10\%$, respectively. The plasma levels of interleukin-12 (IL-12) were also detected by ELISA kit (FineTest, China). The analytical sensitivity of the kit was less than 9.375 pg/ml. The detection range was between 15.625-1000 pg/ml. The intraassay and interassay coefficients of variation were less than 8% and 10%, respectively. The plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) levels were also detected by a commercially available ELISA kit (FineTest, China). The sensitivity of the assay was 0.938 ng/ml, and the intraassay and interassay CV values were $<8\%$ and $<10\%$, respectively. The ELISA kit used for the detection of secretory phospholipase A2 (sPLA2) was purchased from Bioassay Technology Laboratory (Shanghai, China) and the sensitivity was 0.25 ng/ml. The intraassay and inter-assay CV values were $<8\%$ and $<10\%$, respectively. Results are expressed according to the A_{450} values obtained from plasma samples using the calibration curve.

Histopathological Examination

Cardiac and other aforementioned organs samples were immediately fixed in 10 % formalin solution

(pH 7.4-7.6) after necropsy. The tissue samples were fixed for 48 h. After fixation, the tissues were treated with graded alcohol and xylol series and blocked in paraffin at an automatic tissue processor (Leica TP1020, Germany). Sections of 5 µm thickness were cut from the paraffin blocks (Leica 11EG50H, Germany). The sections were placed on slides, deparaffinated in xylene, and rehydrated using decreasing concentrations of ethanol. One set of slides was hematoxylin and eosin (H&E)-stained for the routine histopathological setting (Luna, 1968). The glass slides were evaluated under a digital optical light microscope and images were taken with a camera attachment (Olympus BX51 digital microscope, Japan). For scoring histopathological findings, each tissue section including several organs was obtained by counting 10 fields at 400x magnification (10 HPF).

Lesion scoring and Statistical analysis

For scoring histopathological findings, each tissue section including several organs were obtained by counting 10 fields at 400x magnification (10 HPFs). Lesions were scored semiquantitatively as (0): no lesion, (1): a few lesion, (2): mild, (3): low moderate, (4):

moderate, (5): high moderate, (6): strong. Biochemical data were given as mean ± SE. As the groups showed parametric distribution, OneWay ANOVA was performed, and the Tukey test (post hoc) was used to check the significance of the difference between groups. A value of $P < 0.05$ was considered significant in the tests performed.

Results

Biochemical Findings

Plasma biochemical parameters of the control and treatment groups were given in Table 1. There was no statistical difference between the groups in terms of ALT, Ca, CHO, Ing P, and TP parameters ($P > 0.05$). AST activity was found to be significantly lower in the other groups compared to the GI group ($P < 0.01$). The CK level was found to be significantly decreased in the GIII and GV groups compared to the GI group ($P < 0.05$). The plasma cytokine levels of the control and treatment groups were given in Table 2. There was no statistical difference between the groups in terms of IL-6, IL-12, PAI-1, and sPLA2 parameters ($P > 0.05$).

Table 1. The plasma biochemical parameter levels in control and treated groups (n=10).

Parameters	GI	GII	GIII	GIV	GV
ALT (U/L)	30.22±0.89	35.23±4.50	30.18±0.76	30.8±1.15	30.64±1.06
AST (U/L)	42.38±2.42 ^a	71.81±12.13 ^b	39.19±1.30 ^a	37.21±1.42 ^a	38.36±1.63 ^a
CK (U/L)	61.61±13.59 ^{ab}	87.95±16.67 ^a	40.99±4.29 ^b	59.51±5.32 ^{ab}	47.32±5.63 ^b
Ca (mg/dl)	7.23±0.04	7.12±0.05	7.20±0.06	7.16±0.05	7.08±0.05
CHO (mg/dl)	106.00±3.22	123.40±9.10	111.60±2.60	115.80±3.30	109.00±2.60
Ing P (mg/dl)	7.10±0.28	6.48±0.25	6.61±0.45	7.21±0.51	6.78±0.38
TP (mg/dl)	3.49±0.09	3.57±0.04	3.32±0.14	3.49±0.08	3.43±0.04

^{a,b}: The difference between values with different letters on the same line is significant. ($P < 0.05$; $P < 0.01$).

Table 2. The cytokine levels in control and treated groups (n=10).

Parameters	GI	GII	GIII	GIV	GV
IL-6 (pg/ml)	0.99±0.11	1.02±0.25	1.09±0.24	1.03±0.14	1.03±0.11
IL-12 (pg/ml)	26.20±5.06	23.31±2.11	22.78±1.78	23.47±1.26	23.36±1.91
PAI-1 (ng/ml)	32.47±1.24	33.18±2.44	34.04±5.24	35.61±5.14	33.33±6.35
sPLA2 (ng/ml)	1.68±0.88	2.77±2.39	1.92±1.01	1.63±0.22	1.55±0.59

The difference between values with different letters on the same line is significant. ($P < 0.05$)

Macroscopic Findings

The cardiac appearance was covered with some pale foci in experimental groups although there were no findings in heart of the GI group. Lungs were hyperemic and edematous in appearance in

the experimental groups. In the GI group, only euthanasia-associated artifacts were observed. Livers, kidneys, and spleens were congested and covered with pale areas in experimental groups in spite of no

lesion in the GI group. In the central nervous system (CNS), no visible findings were seen in all groups.

Histopathological Findings

Heart

In the GI group, there were no findings in heart muscles. In only isoproterenol include GII group, loss of sitration, cytoplasmic shrinkage as well as karyopyknosis, karyolysis, and other degenerative findings were evidently seen in many areas. In the GIII group and GIV group, karyopyknosis, karyolysis, and cytoplasmic shrinkage were observed in cardiomyocytes in a few areas. In the GV group, the findings were only localized individually in some cardiomyocytes despite not being distinctive lesions. Histopathological images of the heart tissue of the control and treatment groups are given in Figure 1.

Lung

In the GI group, any findings including degeneration in the alveolar epithelium, vascular congestion, and edema were not observed. In the GII group, moderate hyperemia and edema were common in many areas. In the GIII group, these vascular changes were diminished in spite of being milder degree. Edema was also milder in some areas. There were degenerations in the alveolar epithelium of a few areas. In the GIV group, interalveolar capillary vessels and veins were filled in some areas as being the previous group. Additionally, edema was observed in the alveolar lumina. There were degenerations in only a few areas. In the GV group, there were only a few degeneration alveolar epithelium as well as hyperemia was limited in a few areas. Lung tissue histopathological images of the control and treatment groups were given in Figure 1.

Liver

In the GI group, there were no conspicuous findings at neither hepatocytes nor biliary duct or vessels. In other experimental groups, the general changes belonged to acute cell swelling-vacuolar degeneration and necrosis in hepatocytes. The affected cells had swollen/pyknotic nuclei and clear vacuoles of different sizes. Some necrotic cells lost their nuclei and their cytoplasm were dense pink colored. Additionally, sinusoids and central veins were hyperemic in appearance. In GII group animals, both degeneration at alveolar epitheliums of some areas and vascular congestion were founded at some areas in this manner. Such kind of findings and degenerations were observed in lesser areas in the GIII group and in only a few areas in the GIV group. In the GV group, there were a few degenerative changes at

hepatocytes were present as many as in the GIII group. Histopathological images of the liver tissue of the control and treatment groups are given in Figure 2.

Kidney

In the GI group, there were no conspicuous findings in terms of degeneration (acute cell swelling and vacuolar degeneration) in tubule epitheliums and/or hypercellularization in glomeruli. In the GII group, severe changes including degeneration were common in spite of the previous experimental group. Karyopyknosis, karyolysis, and shrinkage cytoplasm or small vacuoles in cytoplasm were seen in tubule epitheliums. Some glomerules showed hypercellularity. In the GIII group, tubular degeneration and glomerular hypercellularization as well as milder vascular congestion were seen in many areas. In GIV and GV groups, such kind of milder degenerative changes were seen in only some tubules as well as milder vascular congestion in vessels. Histopathological images of kidney tissue in the control and treatment groups were given in Figure 2.

Spleen

In the GI group, neither hemorrhage nor follicle hyperplasia was observed. Thus, there was not any distinctive lesion in the red and white pulp in control animals. In the remaining groups, the main findings were hyperemia, free erythrocytes at the periphery of the follicle. These findings were relatively more increased in GII group. There were follicle hyperplasia and hemorrhage in some areas in this group. In the GIII group, the lesions were encountered in only a few areas. In GIV group, moderate follicle hyperplasia and milder hemorrhage were observed. In GV group, there were milder follicular hyperplasia apart from only a few areas. Other vascular findings were not attended as being previous groups. Histopathological images of spleen tissue in the control and treatment groups were given in Figure 3.

Central Nervous System

In GI group, no findings were encountered in both cerebrum and cerebellum. In experimental group, degenerations (karyopyknosis and cytoplasmic shrinkage in general) were clearly and severely observed in neurons of brain cortex and in purkinje cells of cerebellum in GII group. In GIII group, alterative lesions were seen similarly to previous group at whole cerebrum; but it was observed in only a fewer area. However, they were encountered at lesser fields in brain cortex despite not being common in cerebellum. In GIV group, there was milder degeneration in only a few areas similar to previous group.

In GV group, the findings were not common in every area of brain. But, when compared between boric acid and other experimental groups, degenerations were more diminished in neurons and purkinje cells accordingly to GII group. Histopathological images

of the cerebrum and cerebellum tissue of the control and treatment groups are given in Figure 3. Mean scores of the histopathological findings of the groups were given in Table 3.

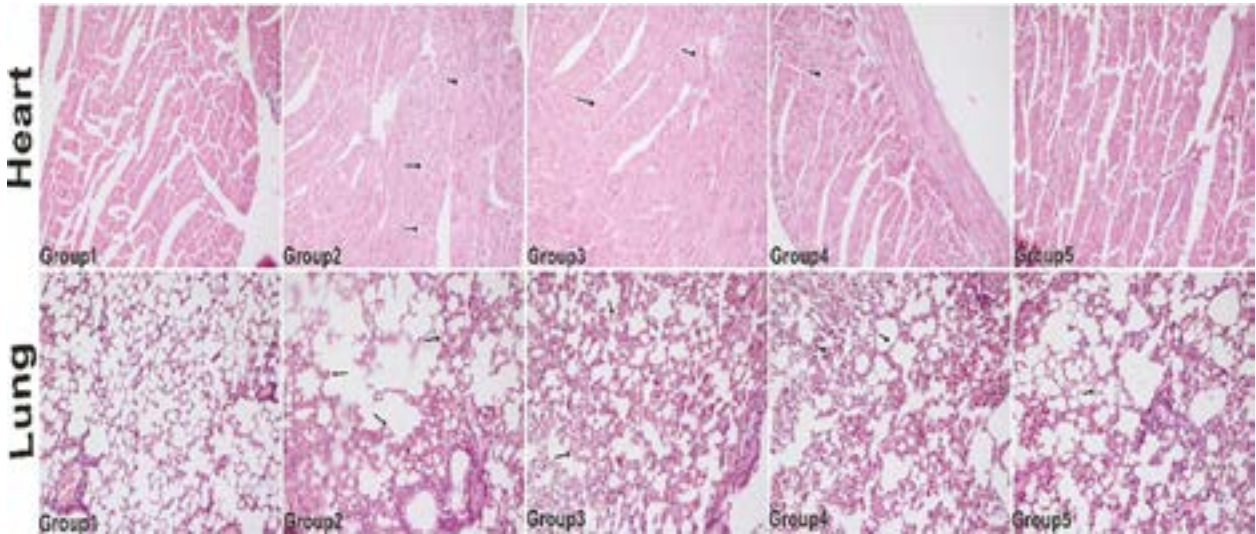


Figure 1. Parachyme degeneration in cardiac muscles (arrows, x200, H&E staining). There is not any lesion in cardiomyocytes in GI group. There is degeneration in some areas of GII group. There is degeneration in a few areas of GIII group. There is degeneration in only a few areas of GIV group. There is no distinctive lesion in cardiomyocytes of GV group. Parachyme degeneration in alveolar epitheliums (arrows, x200, H&E staining). There is not any lesion in parachyme in GI group. There is degeneration in alveol at some areas and moderate vascular congestion as well as edema of GII group. There are degeneration in a few areas, mild-erm vascular congestion and edema of GIII group. There is degeneration in only a few areas, milder vascular congestion and edema of GIV group. There are only a few degenerative alveolar epitheliums of GV group.

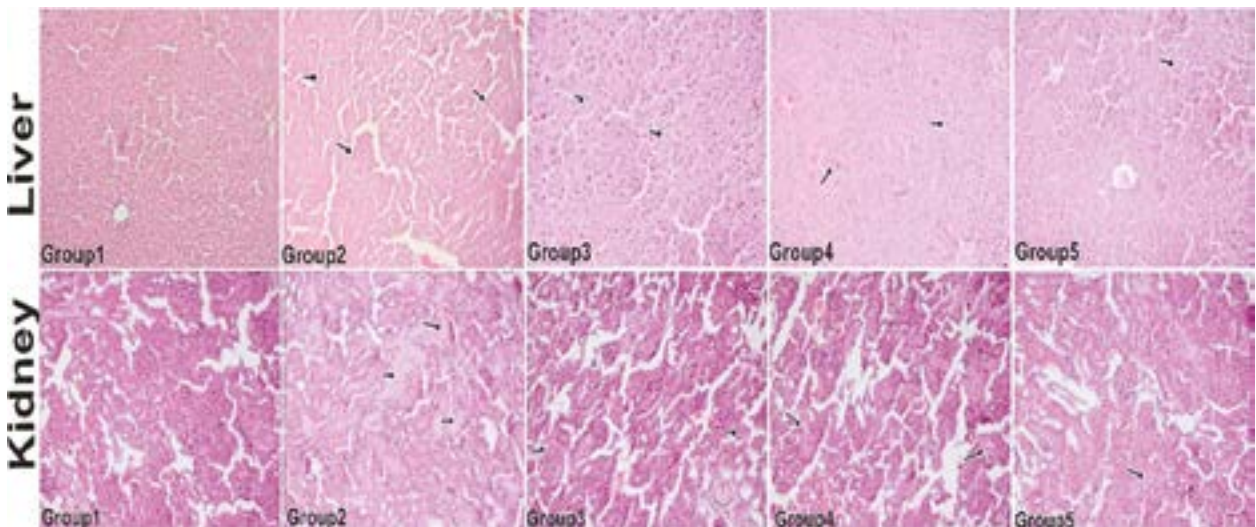


Figure 2. Acute cell swelling and vacuolar degeneration in hepatocytes (arrows, x200, H&E staining). There is not any lesion in hepatocyte in GI group. There is degeneration in alveol at some areas and moderate vascular congestion of GII group. There is degeneration in a few areas of GIII group. There is degeneration in only a few areas, milder vascular congestion and edema of GIV group, There are only a few degenerative hepatocyte of GV group. Acute cell swelling and vacuolar degeneration in renal tubules (arrows, x200, H&E

staining). There is not any lesion in tubule epitheliums in GI group. There is severe degeneration in tubule epithelium of GII group. There is moderate degeneration in a few areas, milder vascular congestion of GIII group. There is milder degeneration in only a few areas, milder vascular congestion of GIV group. There are only a few degenerative tubule epitheliums in GV group.

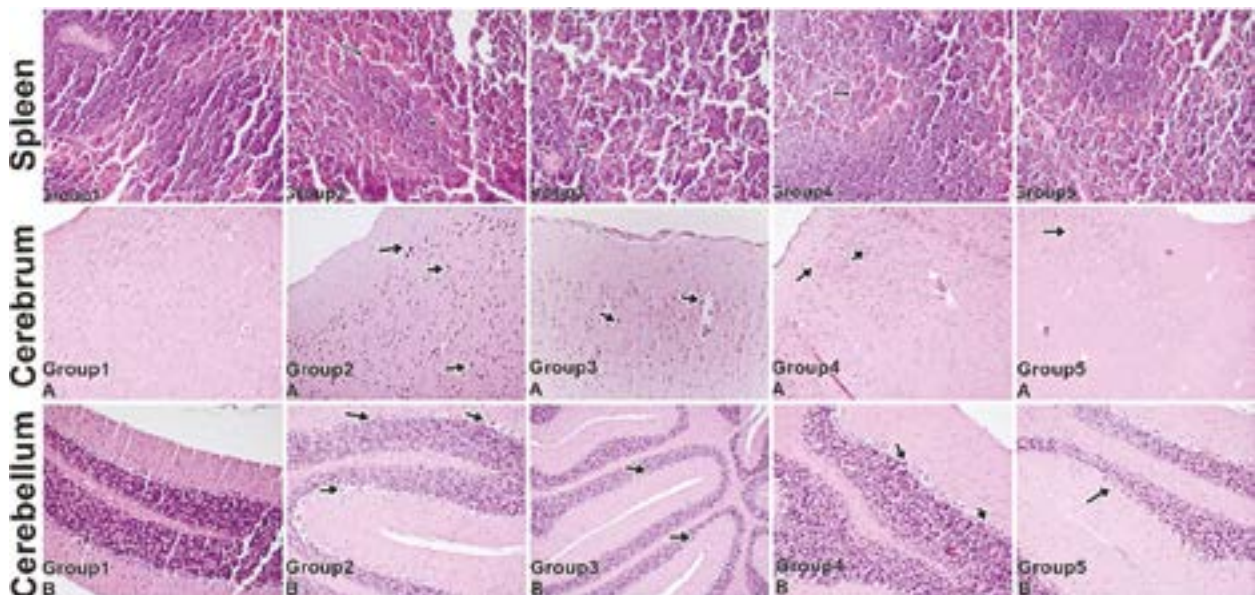


Figure 3. Hemorrhage (arrows) and follicle hyperplasia (asterix) in spleen (x200, H&E staining). There is not any lesion in red and white pulp in GI group. There are follicle hyperplasia and hemorrhage at some areas of GII group. There are lesions in only a few areas of GIII group. Moderate follicle hyperplasia and milder hemorrhage of GIVgroup. There is milder follicle hyperplasia at only a few areas of GV group. Acute cell swelling in cerebrum and cerebellum (x200, H&E). There is not any lesion i neurons in both cerebrum (A) and cerebellum (B) of GI group. There is severe degeneration in neurons of cerebrum (A) and Purkinje cells of cerebellum (B) at some areas of GII group. There is degeneration of neurons in cerebrum (A) and purkinje cells of cerebellum (B) at a few areas of GIII group. GIV: There is milder degeneration in only a few areas of cerebrum (A) and cerebellum (B), GIV group. There are only a few degenerative neurons (A) and purkinje cells (B) of GV group.

Table 3. Mean score $\pm$ standard deviation (SD) of histopathological changes at various organs.

Parameters	GI	GII	GIII	GIV	GV
Heart	0	4	3	2	2
Lung	0	4	3	3	2
Liver	0	6	4	3	2
Kidney	0	5	4	1	0
Spleen	0	4	2	2	1
Cerebrum	0	6	3	2	1
Cerebellum	0	5	3	2	1

The mean scores have been presented 0 to 6. Scores has shown number of degeneration and necrosis in organs at high power fielded microscopy.

Discussion and Conclusion

Herbal products, which are used alternatively in the treatment of various diseases, can be also used in the treatment of cardiovascular diseases (Shaito et al. 2020). Especially due to the serious side effects of drugs used for the treatment of cardiovascular diseases, interest in alternative products is increasing (Liu and Huang 2016). For this reason, the increase in the demand for herbal medicinal products, causes new products to be launched around the world. Although the rate of use of supplements increases, there is not enough information about the effects, contraindications, and side effects of these products (Ekor 2014).

Acute myocardial infarction is a cardiovascular disease that can result in death. The use of isoprote-

renol provides a reliable non-invasive model to examine changes in the body during acute myocardial infarction in terms of histopathological and biochemical changes (Pérez-Cao et al. 1994, Karthick et al. 2006). Isoproterenol, a synthetic catecholamine and β -adrenergic agonist, causes significant disruption of the myocardial membrane and production of reactive oxygen species (ROS), which causes necrosis of the heart muscle (Mukherjee et al. 2010, Lalitha et al. 2013). Oxidative stress and inflammation play a central role in the pathogenesis of myocardial infarction (Neri et al. 2015). Excess ROS damages cardiomyocytes worsen their contractile function and increased capillary leakage that causes cardiac pathology (Sugamura and Keaney, 2011). In such cases, cardiac enzymes such as CK, ALT, AST, and LDH, which are defined as biochemical markers for myocardial damage, can be found in the blood, and the enzyme levels in the blood were increased (Mathew et al. 1985, Karthick et al. 2006, Priscilla and Prince 2009, Mert et al. 2018).

Although there were numerical differences in inflammatory cytokines (IL-6, IL-12) and cardiovascular markers (PAI-1 and sPLA-2) among the trial groups, these differences were not statistically significant. According to the biochemical parameters, histopathological findings are mostly concentrated in the heart and accordingly the liver, brain and cerebellum, kidney, and spleen. Low CK levels showing directly cardiac alterations showed most prominent at GIII and GV groups. At this point, the values are found coherently to previous literatures to be related to acute cardiac failure (Devrim et al. 2017, Mert et al. 2018, Zhou and Ma 2020). Elevated AST and CK levels in GII group are related to disruption of histoarchitecture and alterations in cardiomyocytes as well as other tissues. Boric acid, solely, administration and boric acid and silymarin co-administration have been shown great parallelism in especially heart and other organs. Silymarin administration, solely, has not been preventive effective against degeneration and other vascular changes as much as it has been considered in heart, lung, liver. It is concluded that boric acid might be potentfull for prevention of lesions; however, it is though that its combined effect with silymarin is more elevated.

Various studies have been conducted to investigate the therapeutic roles of different applications against myocardial damage caused by isoproterenol. In a study evaluating the protective effect of rutin, a bioflavonoid, in isoproterenol-induced myocardial infarction, it was reported that serum CK, LDH, AST and ALT activity in the isoproterenol

group increased significantly compared to the control group, and the enzyme levels that had increased with routine application decreased (Karthick et al. 2006).

In addition, it was shown that the enzymatic activity in the heart of the isoproterenol-treated experimental group was significantly reduced compared to the control group. This has been associated with the fact that isoproterenol causes complex biochemical and structural changes that lead to cell damage and necrosis by depleting the energy reserve of heart muscle cells (Rona 1985, Karthick et al. 2006).

In a study by Nivethetha et al. (2009), the protective effect of *M. calabra* plant extract against the cardiotoxic effects of isoproterenol was investigated and an increase in serum AST values was reported in the isoproterenol group compared to the control group. Devrim et al. (2017) also examined the protective effects of periostin against the cardiotoxic effect of isoproterenol in their study on rats and reported that periostin application caused a decrease in CK, AST, ALT and LDH levels, which were increased with isoproterenol application. Similarly, Mert et al. (2018) reported that AST, CK and LDH levels were higher in rats with myocardial damage caused by isoproterenol compared to other groups, and kefir used for protective purposes significantly reduced the toxic effects of isoproterenol and caused a decrease in enzyme levels. In these studies, they reported that isoproterenol application induced AST, ALT and CK levels, possibly due to the increase in the activities of innervated lysosomal enzymes (Abbas 2016, Devrim et al. 2017, Mert et al. 2018).

In this study, the increase in AST and CK enzyme levels after isoproterenol application is compatible with the studies of Abbas 2016, Devrim et al. 2017 and Mert et al. 2018. The decrease in AST and CK enzyme levels in the treatment groups after isoproterenol application is thought to be due to the decrease in the activities of lysosomal enzymes. Significant increases in plasma CK level, which is used as a sensitive biomarker especially in skeletal muscle and myocardium injuries, have also been reported in other studies in rats administered isoproterenol (Tiwari et al. 2009, De Sánchez et al. 2012, Mert et al. 2018) and this is in agreement with the data of this study.

Various studies have revealed that substances with antioxidant activity may be important for therapeutic use in preventing expected heart damage, and may reduce the incidence and mortality from heart disease (McCullough et al. 2012). The increase in AST and CK levels as a result of myocardial dama-

ge induced by isoproterenol (the strongest sympathomimetic drug that affects beta-adrenergic receptors) improved by silymarin and boric acid, whose therapeutic effectiveness was evaluated within the scope of the study, therefore it can be suggested that the silymarin and boric acid have positive effects against excessive increases in enzyme levels. It is thought that it may contribute to protection against myocardial infarction conditions.

Ethical Statement: The study was carried out after the animal experiment approval of the Kırıkkale University Local Ethics Committee (Decision no: 2021/03 - 10).

Financial Support and Conflict of interest: This research no people/organizations that financially support, and the authors do not have any interest-based relationships.

References

- Abbas AM. (2016) Cardioprotective effect of resveratrol analogue isorhapontigenin versus omega-3 fatty acids in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Physiol Biochem.* 72, 469-484.
- Chambers CS, Holečková V, Petrásková L, Biedermann D, Valentová K, Buchta M, Křen V. (2017) The silymarin composition... and why does it matter???. *Food Res Int.* 100(3), 339-353.
- De Sánchez CV, Yañez-Maldonado L, Vidrio-Gómez S et al. Role of nitric oxide in isoproterenol-induced myocardial infarction. In: Fiuza M (Ed.). *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments*, IntechOpen, 2012, DOI: 10.5772/34505.
- Devirian TA, Volpe SL. (2003) The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43(2), 219-231.
- Devrim AK, Sozmen M, Devrim T, Sudagidan M, Cinar M, Kabak YB. (2014) Periostin normalizes levels of cardiac markers in rats with experimental isoproterenol cardiotoxicity. *Bratisl Lek Listy.* 2017; 118(11): 705-709.
- Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* 4, 177.
- Karimkhani H, Özkoç M, Shojaolsadati P, Uzuner K, Donmez DB, Kanbak G. (2021) Protective Effect of Boric Acid and Omega-3 on Myocardial Infarction in an Experimental Rat Model. *Biol Trace Elem Res.* 199(7), 2612-2620.
- Karthick M, Stanely Mainzen Prince P. (2006) Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol.* 58(5), 701-707.
- Lalitha G, Poornima P, Archanah A, Padma VV. (2013) Protective effect of neferine against isoproterenol-induced cardiac toxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 13(2), 168-179.
- Liu C, Huang Y. (2016) Chinese Herbal Medicine on Cardiovascular Diseases and the Mechanisms of Action. *Front Pharmacol.* 7, 469.
- Lu L, Liu M, Sun R, Zheng Y, Zhang P. (2015) Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys.* 72(3), 865-867.
- Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* 3rd Ed., McGraw-Hill, New York, USA, 1968.
- MacDonald-Ramos K, Michán L, Martínez-Ibarra A, Cerbón M. (2021) Silymarin is an ally against insulin resistance: A review. *Ann Hepatol.* 23, 100255.
- Mathew S, Menon PV, Kurup PA. (1985) Effect of administration of vitamin A, ascorbic acid and nicotinamide adenine dinucleotide + flavin adenine dinucleotide on severity of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Indian J Exp Biol.* 23(9), 500-504.
- McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. (2012) Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr.* 95(2), 454-464.
- Mert H, Yılmaz H, Irak K, Yıldırım S, Mert N. (2018) Investigation of the Protective Effect of Kefir against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 38(2), 259-272.
- Mukherjee D, Roy SG, Bandyopadhyay A, Chattopadhyay A, Basu A, Mitra E, Ghosh AK, Reiter RJ, Bandyopadhyay D. (2010) Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms. *J Pineal Res.* 48(3), 251-262.
- Murray FJ. (1998) A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. *Biol Trace Elem Res.* 66(1-3), 331-41.
- Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani D. (2015) Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. *Curr Vasc Pharmacol.* 13(1), 26-36.
- Nivethetha M, Jayasri J, Brindha P. (2009) Effects of Muntingia calabura L. on isoproterenol-induced myocardial infarction. *Singapore Med J.* 50(3), 300-302.
- Papackova Z, Heczkova M, Dankova H, Sticova E, Lodererova A, Bartonova L, Poruba M, Cahova M. (2018) Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One.* 13(1), e0191353.
- Pérez-Cao A, Gil-Loyzaga P, Merchán-Pérez A, Tamargo J. (1994) Effects of oxodipine and nitrendipine on the size of experimental myocardial infarct in the rat. *Pharmacol Toxicol.* 74(6), 321-329.
- Pollard TJ. (2000) The acute myocardial infarction. *Prim Care.* 27(3), 631-649.
- Priscilla DH, Prince PS. (2009) Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 179(2-3), 118-124.
- Rona G. (1985) Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 17(4), 291-306.
- Saleh M, Ambrose JA. (2018) Understanding myocardial infarction. *F1000Res.* 7:F1000 Faculty Rev-1378.
- Shaito A, Thuan DTB, Phu HT, Nguyen THD, Hasan H, Halabi S, Abdelhady S, Nasrallah GK, Eid AH, Pintus G. (2020) Herbal Medicine for Cardiovascular Diseases: Efficacy, Mechanisms, and Safety. *Front Pharmacol.* 11, 422.
- Sugamura K, Keaney JF. (2011) Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* 51(5), 978-992.
- Tiwari R, Mohan M, Kasture S, Maxia A, Ballero M. (2009) Cardioprotective potential of myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Phytother Res.* 23(10), 1361-1366.
- Uluisik I, Karakaya HC, Koc A. (2018) The importance of boron in biological systems. *J Trace Elem Med Biol.* 45, 156-162.
- Vahabzadeh M, Amiri N, Karimi G. (2018) Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review. *J Sci Food Agric.* 98(13), 4816-4823.
- Zhou FT, Ma K. (2020) Fasudil protects against isoproterenol-induced myocardial infarction in mice via inhibiting Rho/ROCK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 24(10), 5659-5667.



Serological survey and molecular investigation of Tick-borne encephalitis virus in Northern Turkey

Gökhan Asal¹, Cüneyt Tamer^{2*}, Harun Albayrak³

¹ Department of Animal Health, Ministry of Agriculture and Forestry, 19 Mayıs, Samsun, Türkiye
^{2,3} Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 31.01.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 09.05.2022

Abstract: Tick-borne encephalitis (TBE) is an endemic viral zoonotic disease in many regions of Eurasia. In this study, whole blood, serum samples and the hard ticks collected from a variety of ruminant species (cattle, goat and sheep) in the middle Black Sea region of Turkey were investigated for the presence of RNA and IgG antibodies against Tick-borne encephalitis virus (TBEV). No TBEV genomic RNA was found in 2625 tick and 708 blood samples. However, serological examination for anti-TBEV antibodies revealed that TBEV IgG antibody was found as follow: cattle 61 of 198 (30.8%), goat 7 of 115 (6.1%) and sheep 15 of 147 (10.2%), and confirmed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Positivity rates for the provinces were as follows: Samsun 12.7%, Sivas 35.2% and Tokat 13.2%. This information supports previous findings of TBEV in ticks in Turkey and may be of relevance for public health considerations (in respect to vaccination recommendations for those exposed).

Keywords: Domestic animals, Real time RT-PCR, Seroprevalence, Tick, Tick-borne encephalitis virus

Türkiye'nin kuzeyinde Tick-borne ensefalitis virüsünün serolojik ve moleküler araştırması

Özet: Kene kaynaklı ensefalit (TBE), Avrasya'nın birçok bölgesinde endemik viral zoonotik bir hastalıktır. Bu çalışmada, Türkiye'nin Orta Karadeniz bölgesinde çeşitli ruminant türlerinden (sığır, keçi ve koyun) toplanan tam kan, serum örnekleri ve sert kenelerde Tick-borne ensefalitis virusuna karşı RNA ve IgG antikorlarının varlığı araştırıldı. 2625 kene ve 708 kan örneğinde TBEV genomik RNA bulunamadı. Bununla birlikte, anti-TBEV antikorları için yapılan serolojik inceleme, TBEV IgG antikorunun: 198 sığırdan 61'i (%30.8), 115 keçiden 7'si (%6.1) ve 147 koyundan 15'i (%10.2) ELISA yöntemiyle pozitif bulunmuştur. İller için pozitiflik oranları şu şekildedir: Samsun %12,7, Sivas %35,2 ve Tokat %13,2. Bu çalışma, Türkiye'deki kenelerde TBEV'nin önceki bulgularını desteklemektedir ve halk sağlığı açısından (maruz kalanlara yönelik aşı önerileri açısından) önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: Evcil hayvanlar, Kene, Real time RT-PCR, Seroprevelans, Tick-borne ensefalitis virüsü

Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is one of the vector-borne viruses that belong to the *Flavivirus* genus in the *Flaviviridae* family (Suss, 2011). It is transmitted to humans either by bites of Ixodid ticks, by ingestion of non-pasteurized milk or milk-products (milk from goats and sheep rather than from cows), or by contact with blood or tissues from TBE patients or viremic livestock (Gritsun et al., 2003a; Lindquist and Vapalahti, 2008; Holzmänn et al., 2009; Kerlik et al., 2018; Ruzek et al., 2019).

TBEV is found in a wide area covering northern Asia and Europe. It has been classified into five main subtypes, the European subtype (transmitted by *Ixodes ricinus*), the Far Eastern, the Siberian subtype (both transmitted by *I. persulcatus*), the Baikalian and the Himalayan subtypes (Ecker et al., 1999; Gritsun

et al., 2003b; Suss 2011; Kovalev and Mukhacheva, 2017; Dai et al., 2018). This disease in humans ranges from asymptomatic to severe infection in the central nervous system (Kaiser, 2012). The fatality rate of the European and Siberian are approximately 1%–3%, while the fatality rate of the Far Eastern subtype might be reached at 20%–40% (Gritsun et al., 2003a; Dorrbecker et al., 2010). In Turkey, only the European subtype is found. However, no outbreaks have been reported until now (Karan et al., 2014; Whitby et al., 1993).

The life cycle of the TBEV in nature includes transovarial and transstadial transmission among ticks and a tick–vertebrate host cycle involving wild and domestic animals. TBEV causes infections in humans, horses and dogs as well (Weissenböck et al., 1998; Klaus et al., 2013; Paulsen et al., 2019, 2020). Ticks are very important to the ecology of

TBEV. The biological role of the ticks is remarkable, not only as virus vectors but also as reservoirs of the virus. However, there is little information about tick species diversity or tick vector capacity in the endemic regions of Turkey. *Ixodes ricinus* ticks are mainly distributed in Northern Turkey. It is likely that the high rainfall and the intensive forest in this area may contribute to this observation (41°25'21"N; 36°57'38"E). Data available on TBEV infection in Turkey, which shares similar climatic and ecological conditions with the endemic regions, is limited (Aydin and Bakirci, 2007; Paulsen et al., 2019, 2020; Suss, 2011). Although studies have found that vector tick (*Ixodes ricinus*) is distributed in Northern Turkey, the number of human cases of TBE in Turkey has been low since the first case occurred in 1968 (Serter, 1968). There are no clinical reports in terms of TBEV in humans in Turkey so far (Ergunay et al., 2011; Yilmaz et al., 2019). To date, there is no evidence of the presence of TBEV in ticks in Turkey (Karan et al., 2014).

With this study, we aimed to determine the prevalence of TBEV among ticks and animals in Northern Turkey, as they are the main organisms involved in the virus life cycle, and also this study was performed to investigate the seroprevalence of anti-TBEV antibodies in domestic ruminants of three provinces of Turkey.

Material and Methods

Tick processing whole blood and serum samples

A total of 2625 ticks and 708 whole blood samples were collected between March and July of 2017 from 93 cattle (99 pools, 183 ticks in total), 106 goats (124 pools, 408 ticks in total) and 509 sheep (556 pools, 2034 ticks in total), grazing in the middle Black Sea region of Turkey. The ticks were collected directly from the animals. After identification using standard keys, ticks were stored at -80°C until testing for the presence of viral RNA (Aktaş and Vatansever, 2014). They were pooled according to size and pools ran-

ged from one to 10 ticks. They were placed in 2 ml of PBS diluent with MagNA Lyser Green Beads (Roche, Mannheim, Germany). Pools were homogenized at 3000 g for 3 min by MagNA Lyser (Roche, Mannheim, Germany). Homogenates were centrifuged in eppendorf tubes at 12 000 g for 3 min to remove the suspended solids, without removing the beads. The supernatants were used for the RNA extraction. At the same time, 460 serum samples were collected from cattle, goats and sheep in the same region (Table 3).

RNA extraction, TaqMan based real-time RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Viral RNA extraction was performed from 200 µl of tick pool supernatant and whole blood samples by using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C. The TaqMan primers and probe were described previously (Schwaiger and Cassinotti, 2003) (Table 1). The real-time RT-PCR (rRT-PCR) was performed with the iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (Biorad, California, USA) by using 5 µl of RNA combined with 10 pmol of each primer and 10 pmol of the FAM- and TAMRA-labelled probe in a 25 µl total reaction volume according to the manufacturer's protocol with the following cycling times and temperatures: 1 cycle of 50°C for 10 min and 95°C for 3 min and 40 cycles of 95°C for 5 s, 60°C for 15 s. The rate of TaqMan assay positivity was calculated by using the 99.9% confidence level settings in the CFX Connect Optic Module Maestro Software (Biorad, Singapore, Singapore). Positive control plasmid of TBEV was kindly provided by Prof. Dr. Manfred Weidmann (Institute for Virology of the University of Göttingen, Germany). The presence of specific IgG antibodies against TBEV was investigated by a commercial ELISA kit (Test Line, Brno, Czech Republic). The sensitivity and specificity of the IgG ELISA for TBEV are 95.7% (data obtained from Test Line).

Table 1. The primers and probe used in the rRT-PCR assay against TBEV (Schwaiger & Cassinotti, 2003).

Primers and Probe	Sequence (5'-3')	Genome position
F-TBE 1	5'-GGG CGG TTC TTG TTC TCC-3'	11054-11071
F-TBE 2	5'-ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT-3'	11099-11121
F-TBE probe	5'-FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA3'	11073-11095

Results

Tick species and distribution

A total of 2625 adult ticks were collected from cattle (99 pools, 183 ticks in total), goat (124 pools, 408 ticks in total) and sheep (556 pools, 2034 ticks in total), in the middle Black Sea region of Turkey (Samsun, Sivas, Tokat) (Fig. 1). The numbers and distribution of tick species according to the collection points on farms are documented in Table 2. Eight tick species were identified and the most abundant were *Haemaphysalis sulcata* 32.4% (850/2625), *Rhipicephalus turanicus* 27.2% (715/2625), *Dermacentor marginatus* 16.6% (437/2625) and *Hyalomma marginatum*

13.3% (349/2625). *Rhipicephalus bursa* represented 6.1% (160/2625) of the total number of ticks. *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma detritum* and *Ixodes ricinus* were less common and represented 3.2% (85/2625), 0.6% (16/2625) and 0.5 (13/2625) of the tick population, respectively. *Ixodes ricinus* was mainly found in Samsun province, which lies in the coastal area of the surveyed region. *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* and *R. turanicus* were found in all provinces in the surveyed region. *Hyalomma detritum* was found in only one location (Tokat). *Hyalomma marginatum*, *Haemaphysalis punctata* and *Haemaphysalis sulcata* were found in only two localities (Sivas and Tokat).



Figure 1. Areas where ticks and samples were collected for Tick-borne encephalitis virus

Table 2. Distribution of tick samples collected by host and provinces.

Provinces	Samsun				Sivas				Tokat				Total		
Ticks	Cattle	Goat	Sheep	Total	Cattle	Goat	Sheep	Total	Cattle	Goat	Sheep	Total	Cattle	Goat	Sheep
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	39		101	140	12	150	407	569	1		5	6	52	150	513
<i>Rhipicephalus bursa</i>	4		18	22		47	66	113	1	19	5	25	5	66	89
<i>Dermacentor marginatus</i>			2	2		13	340	353		7	75	82	-	20	417
<i>Ixodes ricinus</i>	11		1	12						1		1	11	1	1
<i>Hyalomma marginatum</i>					23	5	37	65	80	47	157	284	103	52	194
<i>Haemaphysalis punctata</i>						5	8	13		6	66	72	-	11	74
<i>Haemaphysalis sulcata</i>						1		1		103	746	849	-	104	746
<i>Hyalomma detritum</i>									12	4		16	12	4	-
Total				176				1114				1335	183	408	2034
Total tick samples:													183+408+2034: 2625		

TBEV nucleic acid and antibody detection

A total of 779 tick pools (2625 adult ticks), 708 whole blood samples were tested by rRT-PCR for TBEV. No TBEV genomic RNA was detected in tick pools and whole blood samples. Serological examination of serum samples for anti-TBEV infection revealed

that TBE IgG antibody was present in 61 of 198 (30.8%), 7 of 115 (6.1%) and 15 of 147 (10.2%) cattle, goat and sheep, respectively (Table 3). The provincial distribution of chosen serum samples in this study was as follows: Samsun 12.7% (21/165), Sivas 35.2% (37/105) and Tokat 13.2% (25/190).

Table 3. Seroprevalence of IgG antibodies against TBEV collected from domestic animals in Northern Turkey.

	Cattle (%)	Goat (%)	Sheep (%)	Total
Samsun	20/85 (23.5)	0/38 (0)	1/42 (2.4)	21/165 (12.7)
Sivas	24/50 (48)	-	13/55 (23.6)	37/105 (35.2)
Tokat	17/63 (27)	7/77(9.1)	1/50 (2)	25/190(13.2)
Total	61/198 (30.8)	7/115 (6.1)	15/147 (10.2)	83/460 (18.04)

Discussion and Conclusion

The presented study is aimed to compare the presence of TBEV in various domestic animals in Turkey. We identified TBEV antibodies in cattle, goats and sheep. The majority of the positive serum samples collected from cattle included in this study originated from inland Turkey. This is in the area where human Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) cases have been reported in Turkey, which is transmitted by ticks (Bakir et al., 2005). TBEV positive samples were furthermore detected in the counties of Samsun and Tokat, which are also endemic for tick-borne human cases. This result supports previous findings of TBE antibodies in human blood donors (Ergunay et al., 2007, 2011). The presence of TBE antibodies in domestic animals (sheep) has only been studied in Turkey in the early 1970s. This study from 1971 detected a seroprevalence of 1.3% in sheep sera in southern Turkey (Radda, 1971). In the present study, a total of 460 serum samples was analyzed. The seropositivity rate in cattle (30.8%) was found to be higher than the rate in sheep (10.2%) and goats (6.1%). The previous study from 1971 seems to be based on animals taken almost exclusively from non-endemic areas, which might help explain the low prevalence found in that study (Radda, 1971). Antibodies are detectable in ruminants even 28 months after infection (Balogh et al., 2012; Klaus et al., 2014). The antibody response seems to vary between species, and it is unclear if all animals exposed to the virus develop an immune response (Klaus et al., 2010, 2012; Paulsen et al., 2020). While the age of the animals and their entry into new areas may affect the results of the study, adult animals using the same pasture in more than one season

were used in this study. TBEV specific antibodies were detected in all three provinces of our study in the North of Turkey.

Seroprevalence studies on TBE in domestic animals in Europe have demonstrated that animals may serve as useful sentinels for the detection of TBEV risk areas (Klaus et al., 2010, 2012; Rieille et al., 2017; Salat et al., 2017; Paulsen et al., 2020). A few human seroprevalences were reported in different regions in Turkey concerning IgG antibodies to TBEV, and overall seroprevalence was found to be between 1.1% and 10.5% (Ergunay et al., 2007, 2011; Uyar et al., 2007; Esen et al., 2008; Inci et al., 2016; Yilmaz et al., 2019;). While TBEV antibodies were detected in 1% in Central Anatolia and 0.3% in the Marmara region, no antibodies were detected in other regions (Blacksea, Aegean, Eastern Anatolia, and Southeastern Anatolia regions) (Uyar et al., 2007). In addition, Ergunay et al. (2007) detected 10.5% TBEV seropositivity in the Southeast Anatolia region. The only animal seroprevalence data on TBEV come from the Mediterranean region (Hatay province-southern border) of Turkey. A study from 1971 detected a seroprevalence of 1.3% in sheep sera in southern Turkey (Radda, 1971).

Contrary to our research, Juceviciene et al. (2005) found that the rate of seropositivity in sheep in Lithuania was higher than in cattle and goats. It is thought that the difference between these two studies may occur for two reasons. First, it is thought that ovine breeders in our country are more conscious in the fight against ticks, and the second is that small ruminant herds are grazed in high areas where the humidity and temperature are low in the summer months when ticks are active. It is very difficult

to compare studies that have differences in content (methods, species, sample size and time, geography etc).

Since there is no vaccination program against TBEV in Turkey, it is thought that the source of detected seropositivity is natural infection. The results of serological assays may indicate that the virus is circulating in this area. These results pose a greater risk for people living or visiting the region. In this study, we found no relationship between TBEV RNA in ticks and TBE IgG in serum. The difference may be caused by sampling time and size as mentioned above.

Turkey's tick fauna has been shown to include about 32 species and *Ixodes spp.* have been detected mostly in Northern Turkey, where the amount of rainfall during the year is the highest and intensive forests are the predominant vegetation. Nevertheless, in addition to the Black Sea region, *I. ricinus* activity has been shown to be present in the Mediterranean, Aegean and east/southeast Anatolia (Aydin and Bakirci, 2007). Although TBEV has been detected and characterized in sheep, it has not yet been detected in ticks in Turkey.

This study was carried out in Samsun, Sivas and Tokat provinces in the Black Sea Region, which are suitable for the life cycle of *I. ricinus*. It is estimated that the reason TBEV RNA could not be detected as a result of the study may be due to the low number of tick species that are the main vector (*I. ricinus*) of TBEV among the tick species collected from animals in these provinces. Although more *I. ricinus* ticks were collected in the study of Karan et al. (2014) could not detect TBEV RNA. This situation can be interpreted as that the tick species in our study area are not infected with TBEV.

More seroprevalence studies in domestic animal populations with huge geographical coverage and greater sample size should be carried out. Furthermore, a seroprevalence study on people working in close contact with these animals could provide important epidemiological data for risk evaluation, as they could have been exposed to ticks.

This study put forth the first comprehensive screening of domestic ruminant species in Northern Turkey in terms of TBE antibodies and provides updated information on the distribution of TBEV. This study supports previous findings, which indicates that TBEV is distributed in Turkey, more widely than suggested by human TBE cases. The

results obtained from this study contain important findings in terms of public health.

Use of laboratory animals Ethics Committee and other decisions of Ethics Committee and Permissions:

We designed all study protocols and procedures following the national legislative rules and ethical standards, under validation order by the Samsun Veterinary Control Institute Scientific Ethics Committee, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Turkey (No: 250720167-2, Date: 25/07/2016).

Acknowledgments: We would like to thank the local veterinarians of Black Sea Region for this study. We are grateful to the language edition team for their helpful comments (linguistic correction).

Funding: This work was supported by the Research Fund of the Ondokuz Mayıs University, Project no: PYO.VET.1904.17.008.

Declaration of Competing Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships.

References

- Aktaş M, Vatansever Z. (2014). Ixodid Kene Biyolojisi ve Türkiye Keneleri. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics*. 7(2), 1–8.
- Aydin L, Bakirci S. (2007). Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res*. 101, 163–166.
- Bakir M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran, MA, Vahaboglu H. (2005). Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol*. 54, 385–389.
- Balogh Z, Egyed L, Ferenczi E, Ban E, Szomor KN, Takacs M, Berencsi G. (2012). Experimental infection of goats with tickborne encephalitis virus and the possibilities to prevent virus transmission by raw goat milk. *Intervirology*. 55, 194–200.
- Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. (2018). A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect*. 7, 74.
- Dorrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. (2010). Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis*. 8, 213–222.
- Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 80, 179–185.
- Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S. (2007). Seroprevalence of West Nile virus and tickborne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 7, 157–161.
- Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Litzba N, Sener B, Lederer S, Niedrig M, Hascelik G, Us D. (2011). Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases

- of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health*. 58, 220–227.
- Esen B, Gozalan A, Coplu N, Tapar FS, Uzun R, Aslan T, Ertek M, Buzgan T, Akin L. (2008). The presence of tick-borne encephalitis in an endemic area for tick-borne diseases, Turkey. *Trop Dis*. 38, 27–28.
- Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. (2003a). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*. 57, 129–46.
- Gritsun TS, Frolova TV, Zhankov AI, Armesto M, Turner SL, Frolova MP, Pogodina VV, Lashkevich VA, Gould EA. (2003b). Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J Virol*. 77, 25–36.
- Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, Werner P, Mischak A, Zainer B, Netzer M, Koppi S, Bechter E, Heinz FX. (2009). Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis*. 15, 1671–1673.
- Inci A, Yildirim A, Duzlu O, Doganay M, Aksoy S. (2016). Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective. *PLOS Negl Trop Dis*. 10, e0005021.
- Juceviciene A, Zygutienė M, Leinikki P, Korvenkontio HB, Salminen M, Han X, Vapalahti O. (2005). Tick-borne encephalitis virüs infections in Lithuanian domestic animals and ticks. *Scandinavian J Infect Dis*. 37, 742–746.
- Kaiser R. (2012). Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *The Wien Med Wochenschr*. 162, 239–243.
- Karan T, Tekin S, Bursali A, Keskin A. (2014). Investigation of tick-borne encephalitis virus (tbev) in ixodid ticks collected from central black sea region in Turkey. *J New Results Sci*. 4, 30–35.
- Kerlik J, Avdicova M, Stefkovicova M, Tarkovska V, Valachova MP, Molcanyi T, Mezencev R. (2018). Slovakia reports highest occurrence of alimentary tick-borne encephalitis in Europe: Analysis of tick-borne encephalitis outbreaks in Slovakia during 2007–2016. *Travel Med Infect Dis*. 26, 37–42.
- Klaus C, Hoffmann B, Moog U, Schau U, Beer M, Suss J. (2010). Can goats be used as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) in nonendemic areas? Experimental studies and epizootiological observations. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 123, 441–445.
- Klaus C, Beer M, Saier R, Schau U, Moog U, Hoffmann B, Diller R, Suss J. (2012). Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus–epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick-borne Dis*. 3, 27–37.
- Klaus C, Horugel U, Hoffmann B, Beer M. (2013). Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: Clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol*. 163, 368–372.
- Klaus C, Ziegler U, Kalthoff D, Hoffmann B, Beer M. (2014). Tickborne encephalitis virus (TBEV) - findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC Vet Res*. 10, 78.
- Kovalev SY, Mukhacheva TA. (2017). Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect Genet Evol*. 55, 159–165.
- Lindquist L, Vapalahti O. (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 371, 1861–1871.
- Paulsen KM, das Neves CG, Granquist EG, Madslie K, Stuen S, Pedersen BN, Vikse R, Rocchi M, Laming E, Andreassen AK. (2020). Cervids as sentinel-species for tick-borne encephalitis virus in Norway - A serological study. *Zoonoses Public Health*. 67, 342–351.
- Paulsen KM, Stuen S, das Neves CG, Suhel F, Gurung D, Soleng A, Stiasny K, Vikse R, Andreassen AK, Granquist EG. (2019). Tick-borne encephalitis virus in cows and unpasteurized cow milk from Norway. *Zoonoses Public Health*. 66, 216–222.
- Radda A. (1971). Antibodies against group A and B arboviruses in domestic animals from Turkey. *EUTip Fak Mecmuası*. 10, 227–230.
- Rieille N, Klaus C, Hoffmann D, Peter O, Voordouw MJ. (2017). Goats as sentinel hosts for the detection of tick-borne encephalitis risk areas in the Canton of Valais, Switzerland. *BMC Vet Res*. 13, 217.
- Ruzek D, Zupanc TA, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, Kholodilov I, Knap N, Kozlovskaya L, Matveev A, Miller AD, Osolodkin DI, Överby AK, Tikunova N, Tkachev S, Zajkowska J. (2019). Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res*. 164, 23–51.
- Salat J, Mihalca AD, Mihaiu M, Modry D, Ruzek D. (2017). Tickborne encephalitis in sheep, Romania. *Emerg Infect Dis*. 23, 2065–2067.
- Schwaiger M, Cassinotti P. (2003). Development of a quantitative realtime RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol*. 27, 136–145.
- Serter F. (1968). Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. *EU Tip Fak Mecmuası*, 7, 1–13.
- Suss J. (2011). Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick-borne Dis*. 2, 2–15.
- Uyar Y, Akcali A, Carhan A, Ozkaya E, Ertek M. (2007). Seroprevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) among cases with tick bite history in Turkey. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 64, 21–25.
- Weissenböck H, Suchy A, Holzmann H. (1998). Tick-borne encephalitis in dogs: Neuropathological findings and distribution of antigen. *Acta Neuropathol*. 95, 361–366.
- Whitby JE, Whitby SN, Jennings AD, Stephenson JR, Barrett ADT. (1993). Nucleotide sequence of the envelope protein of a Turkish isolate of tick-borne encephalitis (TBE) virus is distinct from other viruses of the TBE virus complex. *J Gen Virol*. 74, 921–924.
- Yilmaz H, Barut K, Karakullukcu A, Kasapcopur O, Kocazeybek B, Altan E, Cizmecigil UY, Yilmaz A, Bilgin Z, Esatgil MU, Klaus C, Richt JA, Turan N. (2019). Serological evidence of tick-borne encephalitis and west nile virus infections among children with arthritis in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 19, 446–449.



Investigation of Restaurants in Beyoğlu Istanbul, in terms of Hygiene Criterias and Food Safety

Mehmet Hakan Tabak^{1*}, Özer Ergün²

¹ Pendik Veterinary Control Institute, Laboratory of Bacteriology, Istanbul, Türkiye

² Istanbul Health and Technology University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Istanbul, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 17.05.2022

Abstract: This study was carried out in the Beyoğlu region, where the daily food consumer population is high and the most visited by local and foreign tourists in Istanbul. The aim of the study was to determine the hygienic conditions of the personnel and restaurants. 100 Restaurants were checked twice with the pre-prepared check-lists and scored. In each control, 4 surfaces and equipments, 4 personnels and 1 air sample were taken. 5 water sample was taken to determine the microbiological status of the water. Hygienic conditions of the restaurants were determined by microbiological analysis of the samples. As a result of the checks made with the prepared form according to national and international good hygiene practices forms, restaurants were found to be 75% proper in terms of general hygiene conditions, storage hygiene, production hygiene, personnel hygiene and personnel training criterias. The samples taken for the surfaces and equipment hygiene were found improper as 7.5% for *E. coli*, 23.7% for coliform and 10.9% for aerobic mesophilic bacteria. In terms of personnel hygiene, samples were found improper as 9.6% for *E.coli*, 17.7% for coliform and 22.5% for *S.aureus*. Air hygiene samples were found proper as 92.5%. All 5 water samples analyses resulted properly. All total polar compounds measurements made on frying oils have been appropriately concluded.

It was determined that food safety management systems are not used in the restaurants and the basic contamination factor was personnel who has inadequate hygiene knowledge and the restaurants that don't have effective cleaning and disinfection plans.

Keywords: Food Safety, Hygiene, Public Health, Restaurants

İstanbul Beyoğlu ilçesi toplu tüketim yerlerinin gıda güvenliği ve hijyen kriterleri yönünden incelenmesi

Özet: Bu çalışma, İstanbul'da günlük gıda tüketen nüfusun yoğun olduğu ve yerli ve yabancı turistlerin en çok ziyaret ettiği Beyoğlu bölgesinde gerçekleştirildi. Çalışmanın amacı, personel ve restoranların hijyen koşullarının belirlenmesidir. 100 Restoran, önceden hazırlanmış kontrol listeleri ile iki kez kontrol edilerek puanlandı. Her kontrolde 4 yüzey ve ekipman, 4 personel ve 1 hava numunesi alındı. Suyun mikrobiyolojik durumunu belirlemek için 5 adet su numunesi alındı. Örneklerin mikrobiyolojik analizleri yapılarak restoranların hijyenik koşulları belirlendi. Ulusal ve uluslararası iyi hijyen uygulama rehberlerine uygun olarak hazırlanan form ile yapılan kontroller sonucunda restoranların genel hijyen koşulları, depo hijyeni, üretim hijyeni, personel hijyeni ve personel eğitim kriterleri açısından %75 uygun olduğu tespit edildi. Yüzey ve ekipman hijyeni için alınan örnekler *E. coli* için %7,5, koliform için %23,7 ve aerobik mezofilik bakteriler için %10,9 olarak uygunsuz olarak bulundu. Personel hijyeni açısından numuneler *E.coli* için %9,6, koliform için %17,7 ve *S.aureus* için %22,5 olarak uygunsuz bulundu. Hava hijyeni örnekleri %92,5 olarak uygun bulundu. 5 Su numunesinde yapılan analizler ve tüm kızartma yağlarında yapılan polar madde ölçümleri uygun olarak sonuçlandı. Restoranlarda gıda güvenliği yönetim sistemlerinin kullanılmadığı belirlendi. Temel kontaminasyon faktörleri ise yetersiz hijyen bilgisine sahip personel ve restoranların etkin temizlik ve dezenfeksiyon planı olmaması olarak belirlendi.

Anahtar kelimeler: Gıda Güvenliği, Halk Sağlığı, Hijyen, Toplu Tüketim

Introduction

People's food consumption habits are changing due to reasons such as industrialization and taking place more effectively in business life. Especially in countries that have completed industrialization, more than half of the population eat 1 meal a day out

of the home. This type of consumption habit creates new risks and threatens public health (Sezgin and Özkaya, 2014). Insufficient hygienic conditions in the food process until consumption and the possible contaminations cause hazards (Fidan and Ağaoğlu 2004).

Yazışma adresi / Correspondence: Mehmet Hakan Tabak, Bati Mh. Yunus Cd. No:2/1, Pendik- İstanbul, Türkiye
e-mail: mehmethakan.tabak@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-3941-7172 • ²0000-0003-1675-7238

The food safety process starts from farms or fields and continues until the ultimate consumer. The selection of raw material, processing, storage and distribution constitute the steps of this process. An insufficient point can lead to food poisonings and outbreak in this food safety approach, which is also accepted in the EU and in the USA. Food-borne disease rates in industrialized countries are up to 30 %, according to WHO reports (Giray and Soysal, 2007; Lazou et al. 2012). The increasing of the population and the food demand cause the rising of the concerns related to food safety, especially in big cities. Changes on food consumption habits, new technologies in food processing, environmental pollution and illegal production lead to consist risks on food safety (McCarthy et al. 2007; Erkmen 2010).

Food-borne diseases are also an important reason for slowing the economic growth of countries and appear in both developed and developing countries, but developing countries deal with rougher circumstances. They impose an economic and social burden on society in developed countries. There are 76 million food-borne disease cases, which 325.000 are inpatient treatment, occur every year in the USA and the annual number of deaths was reported as 5.000. Approximate cost is \$ 152 billion per year. Foodborne disease are one of the major reasons of infant mortality all over the world, and considered that approximately 1.9 million children die from diarrhea due to food-borne diseases each year (Mead et al. 1999; WHO 2002, 2015).

There are 1499 restaurants in the Beyoglu district of Istanbul which is frequently visited by local and foreign tourists (FSIS, 2018). The main contamination factors are staff, raw materials, surfaces, equipment, water and especially the cross contaminations that might occur during the pre-service step in such operations (Bas 2004; Ugur et al. 2001).

Restaurants have to complete pre-requisite programs before the implementation of food safety systems, such as HACCP. These programs include; features of operation, processing area and layout, waste management, equipment suitability, cleaning and disinfection, pest control, personnel training and hygiene, reprocessing, recalling, storage and distribution and the traceability of products. (Ariosti 2016)

This study was carried out in the Beyoglu region where one of the most visited districts in Istanbul, to research the hygiene level of restaurants and aimed the protection of consumer and public health

through the detection of the possible hazards in the operations.

Materials and Methods

Material: 100 restaurants, that have at least 4 or more employees, were selected in the Beyoglu district. Sampling were completed in 2016. Swabs were taken as 4 employees, 4 contact surfaces and equipment and 1 air sample was taken from each restaurant. Every restaurant was visited twice. The total number of swab samples from employees, surfaces and equipment is 1800. Water hygienic measurement were performed with 5 samples, cause of using city water in any restaurant. The total polar compounds of frying oil is monitored by taking 25 oil samples from restaurants. All samples were stored 4° C, and transported to laboratory within 2 hours to be analyzed on the same day. The restaurants were inspected with pre-prepared checklist.

Microbiological Analysis of Personnel, Surface and Equipment Samples: Samples from personnel, surfaces and equipment (work surfaces, cutting board, knife, clean plate) were taken in accordance with the double swab (wet-dry swab) technique and ISO standards (ISO, 2018). Equipment and surface samples were taken 25 cm² of material and employees' samples were taken from hand and fingers. The swabs were broken and put into test tubes (Anon. 1987; ISO 2018). Tubes were mixed and prepared with saline solution to passage of the microorganisms in proper dilution. Total mesophilic aerobic bacteria isolated and counted by using Plate Count Agar (PCA; Oxoid CM0463), incubated at 37° C for 48 hours (ISO 2018, 2013). *E.coli* isolation and counting were performed by using Tryptone Bile X-glucuronide Agar (TBX, Oxoid CM0945), incubated at 30° C for 4 hours, and then at 44° C for 18 hours. The bluish-green colonies were considered positive (ISO 2001, 2018). *S. aureus* isolated and counted by using of Baird Parker Agar (BPA; Oxoid CM1127) with egg yolk and potassium telluride. Typical and atypical colonies were isolated at 37° C after 48 hours. Catalase and coagulase tests were performed on suspicious colonies by using Brain Heart Infusion Agar (BHIB-Oxoid CM225) (ISO 1999, 2018). Coliform bacteria isolated and counted by using Violet Red Bile Lactose Agar (VRB; Oxoid CM0968), after 24 hours incubation at 37° C, colonies were formed reddish zone, have 1-2 mm diameter areas. Suspicious colonies were incubated at 37° C for 24 hours by using Brilliant Green Bile Lactose

Broth (BGLB, Merk 1.05454) and the gas production was commented as positive (ISO 2018, 2006).

The reference values were determined from other similar studies in literature, due to the lack of common international reference for the microbiological criterias.

* Clearly defined surfaces (cfu / cm²): TMAB <10, coliform: 0, *E. coli*: 0

* Surface and equipment in use (cfu / cm²): TMAB <1.000, coliform <10, *E.coli*: 0

* Hand of personnel (cfu / cm²): coliform <10, *E.coli*: 0, *S.aureus*: 0 (Aksu and Kaya 1999; Ayçiçek et al. 2006; Little and Sagoo 2009).

Water Samples: 5 water samples were taken from the kitchens of restaurants, which use the city water. Water samples were collected in 250 ml sterile containers (TSE 2006). Colonies were analyzed by membrane filtration technique using Brilliance *E. coli* / Coliform Selective Medium (BES; Oxoid CM1046) in accordance with standards (ISO 2014). Enterococcus analysis were performed by using Slanetz Bartley Agar (SBA; Oxoid CM0377) by membrane filtration (TSE 2002). 100 ml of filtered water incubated 24 hours for *E. coli* / coliform and 48 hours for enterococcus at 37°C. The results were interpreted in accordance with "Regulation on Water for Human Consumption" (Anon. 2013c).

Air Samples: The petri dish was opened in the area of production and the classical method was used, for the detection of molds and yeasts in the air (Pitt and Hocking 1999, Çöl and Aksu 2007). The petri dish was opened in the kitchen and waited for 15 minutes, the petri was covered and the samples were brought to the laboratory to incubate. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC: Oxoid CM0727) agar was used to detect yeast mold in the

air and colonies formed in petri dishes after 5 days at 25°C. The colony number was calculated by taking averages of 2 visits. Results were converted to cfu/m³ unit by Omelinasky Formula. $N = 5a \times 10^4 (bt)^{-1}$ $N = \text{cfu/m}^3$ (colony forming in 1 m³), a = number of colonies counted in petri dish, b = petri zone as cm², t = waiting time in minutes (Awad and Mawla 2012). As a result of analysis findings, the recommended number of molds and yeasts, isolated from the 65 cm² petri dishes, after 15 minutes, was determined as <18 cfu / petri dish.

Detection of Polar Compounds in Frying Oils: Total polar compounds measurement was performed with calibrated Testo-270 Frying Oil Tester (Testo Inc. Germany). The interpreting of the results were carried out within the legal limits (Anon. 2012).

Hygiene Scoring of Restaurants: The hygiene scoring process was carried out using the criterias stated in the control forms. The scoring was calculated by averaging of each the 2 visits to the restaurants. The form was prepared previously and had 5 basic topics (Anon. 2011, Anon. 2013a, Anon. 2013b). These were General Hygiene Status, Storage Hygiene, Production Hygiene, Personnel Hygiene and Personnel Training sections. A control form includes 36 questions and scored out of 100 points. The total scoring was interpreted as table 1.

Table 1. Hygiene Scoring Table

Scoring	Explanation	Point
A	Very Good	90-100
B	Good	70-89
C	Average	50-69
D	Unsufficient	40-49
E	Bad	0-39

Findings

Table 2. General Hygiene Results

A- General Hygiene Criterias		Number of the Establishments	Number of the Proper Establishments	Rate of Proper Establishments
1	Is there technical staff who is responsible of food safety? Is there external technical support?	100	22	22
2	Is a Food Safety Management System implemented? Which?	100	15	15
3	Fllors, walls, ceilings in production and storage areas; It must be robust, easily cleanable, waterproof and made from suitable materials.	100	77	77
4	Precautions should be taken against the risk of breakage of the windows, dirt accumulation and insect entry should be prevented.	100	80	80
5	Hygienic mats should be used in the area where the toilets are and toilet doors shouldn't be open into the production area.	100	89	89
6	Must have adequate and clean dressing area	100	81	81
7	Regular pest control must be made and recorded	100	94	94
8	The food must be regularly monitored and recorded at the acceptance, storage and processing stages.	100	42	42
Rate of Total Proper Establishments		100		62,5

Table 3. Storage Hygiene Results

B- Storage Hygiene Criterias		Number of the Establishments	Number of the Proper Establishments	Rate of Proper Establishments
9	Cleaning materials must be stored in different areas of the kitchen.	100	74	74
10	There should be refrigerators with suitable capacity and temperature records should be monitored	100	69	69
11	Food storages must be done according to proper storage conditions and capacity. Temperatures should be monitored.	100	76	76
12	Stoarge must be higher than floor level and storage material should be easy to clean.	100	81	81
13	The inside of the storage should be checked for moisture	100	18	18
Rate of Total Proper Establishments		200		63,6

Table 4. Production Hygiene Results

C- Production Hygiene Criterias		Number of the Establishments	Number of the Proper Establishment	Rate of Proper Establishments
14	All surfaces must be easy to clean, robust and hygienic.	100	82	82
15	There must be hot water, soap and drying material in the sinks	100	25	25
16	Equivalent illumination to the daylight must be provided, caution must be taken against breakage.	100	88	88
17	Ensure adequate ventilation.	100	77	77
18	Sufficient dishwashing area or dishwasher must be available.	100	95	95
19	Waste should be removed quickly or stored separately.	100	75	75
20	The garbage bins must be constructed to prevent contamination.	100	76	76
21	Raw and cooked food must be stored in different places.	100	84	84
22	The preparation dates of risky food in storage must be written on them.	100	37	37
23	Self-service products must be protected against external contamination.	100	86	86
24	Vegetables (fruit, vegetables, etc.) must be processed in separate areas.	100	82	82
25	All equipments must be in compliance with regulations, not rusty, broken, or unsuitable.	100	92	92
26	The packaging material must be in compliance with the legislation and avoid contamination during storage.	100	94	94
27	All equipments should be used for food processing and storage.	100	100	100
28	The installation of the equipment and machinery must allow hygienic activities.	100	72	72
29	Cross-contamination cause of equipments should be avoided.	100	98	98
30	Frying oil must be checked.	25	25	100
31	The water must have drinkable properties.	100	100	100
Rate of Total Proper Establishments		100		80,1

Table 5. Personnel Hygiene Criterias

D- Personnel Hygiene Criterias		Number of the Establishments	Number of the Proper Establishment	Rate of Proper Establishments
32	Clean clothes, gloves, mask, bone for production must be used	100	65	65
33	Personnel must obey the hygiene criterias and the hands should be washed accordingly.	100	65	65
34	There must be no wounds on the hands during production and accessories such as jewelry, watches should not be used	100	67	67
Rate of Total Proper Establishments		100		65,6

Table 6. Personnel Training Criterias

E- Personnel Training Criterias		Number of the Establishments	Number of the Proper Establishment	Rate of Proper Establishments
35	All personnels must be trained in basic hygiene and continuous on-the-job training	100	26	26
36	Personnel must have food allergen knowledge, and warn consumers	100	12	12
Rate of Total Proper Establishments		100		19

Table 7. General Hygiene Scoring Table

Score	Range of Points	Number of Establishments and Rates	Average Point
A	90-100	12 (%12)	93
B	70-89	64 (%64)	76
C	50-69	22 (%22)	65
D	40-49	2 (%2)	48
E	0-39	0	0
Total		100	75

Table 8. Polar Compounds Measurement

Frying Oil	Number of Restaurants	Number of Sample	Range of Polar Compounds Measurement	Average Polar Compounds	Number of Restaurants which has Polar Measurement Device	Suitability with Regulations (%Polar Compounds ≤ 25)
Total	25	25	7-21	16.0	17	25 (%100)

Table 9. Air Hygiene Samples

Air	Number of Samples (n)	Mold-Yeast Detected Samples and Rates	Average Mold-Yeast (cfu/petri)	Mold-Yeast Detection Range (cfu/petri)	Proper Samples and Rates (< 18 cfu/petri)
Total	200	150 (%75)	12.6	0-101	185 (%92.5)

Table 10. Equipments and Surface Samples

Food Contact Surfaces and Equipments	Number of Samples (n)	Criterias and Eligibility Rates						Proper Samples	
		E.coli		Coliform		TMAB		Number	Rate (%)
		Number	Rate (%)	Number	Rate (%)	Number	Rate (%)		
Cutting Board	200	190	95	142	72	149	74.5	124	62
Work Surfaces	200	176	88	158	79	196	98	141	70.5
Knives	200	185	92.5	134	67	192	96	121	60.5
Plates	200	189	94.5	177	88.5	176	88	168	84
Total	800	740	92.5	611	76.3	713	89.1	554	69.2

Table 11. Water Samples

Water	Number of Samples (n)	Criterias and Eligibility Rates						Proper Samples	
		E. coli		Enterococcus		Coliform		Number	Rate (%)
		Number	Rate (%)	Number	Rate (%)	Number	Rate (%)		
Total	5	5	100	5	100	5	100	5	100

Table 12. Personnel Hand Samples

Personnel	Number of Samples (n)	Criteria and Propriety Rates						Proper Samples	
		E.coli		Coliform		S.aureus			
		Number	Rate (%)	Number	Rate (%)	Number	Rate (%)	Number	Rate (%)
Total	800	723	90.4	658	82.3	620	77.5	570	71.2

Discussion and Conclusion

Inspection with check-list resulted as; 62.5% proper for general hygiene conditions, 63.6% for storage hygiene conditions, 80.1% for production hygiene conditions, 65.6% for personnel hygiene and 19% for personnel training. Restaurants were found good in terms of production hygiene, poor in terms of personnel training, and moderate in terms of other criterias. Only 15% of restaurants use food safety management systems effectively and the technical staff is inadequate. Lack of efficient traceability systems for raw materials and final products cause a significant risk for food safety. Insufficient control of moisture in food storage is considered a negative feature for storage hygiene. The steps of preparing and freezing animal-originated food are considered high risk in restaurants. In terms of personal hygiene, the hand washing procedures were defined not so well in restaurants and cautions weren't taken against using of jewelry and accessories. Personnel dressing procedures are interpreted poorly. Training of employees were found poor and the allergen knowledge of employees prove that clearly. In a study conducted by Kothe et al. (2016) among street vendors, the conditions and cleanliness of personnel clothes were found as %60 inappropriate, and maintenance of prepared food at temperature above 60° or below 5° was found %50 inappropriate. Ratnasari et al. (2018) revealed the presence of food components and cooked foods under inadequate storage conditions was associated with a high rate of *E.coli* contamination. In the same study, employees in food businesses were found to be inadequate in terms of food processing knowledge by 17.6% and by 66.7% in terms of personal hygiene. Liu et al. (2015) found the employees had food hygiene knowledge at the rate of 54.4%, and the 4.09% of the workers answered "always" the question about mixing of raw and cooked food containers in the Guandong region of China. Lee et al. (2017) revealed that although it was determined that 61.7% of the food workers had good food hygiene knowledge, the samples taken from their hands were determined high for total aerobic bacterial

load at university canteen in Kuala Lumpur. In the study conducted by Yoshimoto and Zapechelnyuk (2019) in the United Kingdom, was found that there is a negative correlation between the food quality and hygiene conditions, the production and processing conditions are insufficient in restaurants with world-renowned quality awards.

The highest microbiological risk was detected on knives and cutting boards. Legnani et al. (2003) determined *E. coli* as 16.7% and TMAB as 6.7% on the working surfaces. Dümen et al. (2009) stated proper surface samples in terms of TMAB as 83.5%, coliform as 91% and *E.coli* as 89%. Rodionava et al. (2018) determined $(6.4 \pm 1.1) \times 10^2$ cfu/cm² microorganisms in one hour on washing tables in meat processing enterprises. In the study conducted by 90 restaurants, it was revealed that meat processing benches and knives in kitchens are the most contaminated areas in terms of total coliform bacteria at all hours of the day (Lopašovský et al., 2021).

The 800 samples collected from employees in the kitchen were found proper 77.5% for *S. aureus*, 82.3% for coliform bacteria, 90.4% for *E.coli* and 71.2% for all three (Table 12). Lack of a regular hand washing procedure, hygienic drying materials and continuous hot water supply are interpreted as main reasons. In the study of Civan (1993), personal hand hygiene was founded as 32% proper. Konecka-Matyjec et al. (2012) found that 97.2% proper for the coliform and 98% proper for *S.aureus* on personnel. Fidan and Ağaoğlu (2012) found that *E.coli* positivity rate was 70% in the hands of restaurant employee in Ağrı province. In the study of Akarca et al. (2015) that was conducted in dairies in Afyon, the employee' hand hygiene results were concluded as; *E.coli* as 0.67%. Aydin et al. (2007) identified coagulase-positive *S.aureus* in 38.7% of personal hands samples in the production and 34% in the service. Temelli et al. (2005) found that *E.coli* was 37.5% on butchers' hands, 28.5% on dairy farmers, and 40% coagulase-positive staphylococcus on butchers' and dairy farmer's hands. Paul et al. (2021) found between $6.0 \times 10^1 - 1.5 \times 10^2$ cfu/cm² microorganisms in food handling surfaces of local restaurants in Bangla-

desh. Yentür – Doni et al. (2019) isolated *S. pyogenes* as 22 (35.5%) of 62 throat swabs in their study in university canteen. In the study conducted by 220 food workers, bacteria isolated at a rate of 62.2% in the samples taken from the nails of the workers, and 46% of them were *S. aureus* and 29.2% were *E.coli*. *S.aureus* was detected in 65.4% of nasal swabs and *Shigella boydii* was detected in 0.9% of rectal swabs (Nasrolahei et al., 2017). Yap et al. (2019) found in sushi restaurants, 21.7% positive for *S.aureus* in foods and 30% on the hands of employees, and this rate decreased to 0 by changing gloves and hand washing. Getie et al. (2019) made isolation from samples taken from the hands of food workers as 10.1% *Shigella spp*, 1.9% *E.coli* O157:H7 and 1.2% *Salmonella spp*.

200 air samples taken from production areas of the restaurants were resulted in 92.5% proper for mold and yeast isolation. The average number of colonies was found as 12.6 cfu/petri dish and the colony range was found between 0-158 (Table 9). The study of Dülger (2004), detected 1-9.8 cfu/petri dish mold-yeast in meat-processing area of supermarkets. Kang and Frank (1989) suggest that the amount of mold-yeast that should be <430 m³.

All of the 5 samples taken to specify the microbiological properties of the city water that used in all the restaurants, have been concluded in accordance with the legal regulations (Table 11). Any enterococcus, coliform and *E.coli* have not been isolated (Anon. 2013c). Regular control of the city water reduces the risk of contamination to the minimum level.

25 of the 100 controlled restaurants had actively frying operation. All of the polar compounds measurements made in these restaurants were proper (Table 8). Measures have been assessed within the legal limits (Anon. 2012). Polar compounds measurement range was found between 7-21 and an average of 16 was found. Restaurants have their own device to make measurements and have self-limits that are lower than the legal limits. Hampikyan et al. (2011). found polar compounds between 1,5 and 40 and polar compounds measurement results showed that 68% of the restaurants are under the legal limits.

All the results show the inadequate and need to be improved sections of the restaurants. All restaurants need good hygiene practices and beyond that a food safety system, such as HACCP. Main pre-requisite problems still constitute difficulty to improve restaurant and personal hygiene standar-

ds. Internal or external audits play an important role and lack of such private or official controls lead breaking of the food safety chain.

Use of laboratory animals Ethics Committee and other decisions of Ethics Committee and Permissions: Ethical committee permission was not obtained due to lack of study on experimental animals.

Acknowledgement: This Project was supported by Research Fund of Istanbul University. Project No. 52638

References

- Akarca G, Tomar O, Çağlar A. (2015). Afyonkarahisar ilinde Faaliyet Gösteren Süt İşletmelerinin, Hijyen ve Sanitasyon Koşullarına Uygunluğunun Araştırılması. *Kocatepe Veterinary Journal*. 8(2), 27-35.
- Aksu H, Kaya İ. (1999). Gıda Sanayinde Personel Hijyeni. *TMMOB Gıda Mühendisliği Dergisi*. 3(7), 15-19.
- Anon. (1987). Commission of The European Communities (CEC). *Code of good hygienic practices*. EC-Document VI/5938/87 (PVET/2140).
- Anon. (2011). Gıda Hijyeni Yönetmeliği. Access address: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-5.htm>, Date of access: 15.10.2021.
- Anon. (2012). Kızartmada Kullanılmakta Olan Katı ve Sıvı Yağlar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği. Access address: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/05/20120512-5.htm>, Date of access: 15.10.2021.
- Anon. (2013a). Safe Catering – Your Guide to Making Food Safely. Access address: https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/safe-catering_0.pdf, Date of access: 15.10.2021.
- Anon. (2013b). Food hygiene a guide for businesses. Access address: <https://www.food.gov.uk/business-guidance/food-hygiene-for-your-business>, Date of access: 15.10.2021.
- Anon. (2013c). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Access address: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/10/20161020-3.htm>, Date of access: 15.10.2021.
- Ariosti A. (2016). Managing contamination risks from packaging materials. Lelieveld H, Holah J, Gabric D. eds. *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing, Cambridge. p.163.
- Awad, A.H, Mawla, H.A. (2012). Sedimentation with the Omeliansky Formula as an accepted technique for quantifying airborne fungi. *Polish Journal of Environmental Studies*. 21(6), 1539-1541.
- Ayçiçek H, Oğuz U, Karci K. (2006). Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *International Journal Hygiene Environment Health*. 209(2), 203-206.
- Aydın A, Aksu H, Arun O. O. (2007). Hygienic properties of food handlers and equipment in food production and sales units. *Medycyna Wet*, 63(9), 1067-70.
- Bas M. (2004) *Besin Hijyeni Güvenliği ve HACCP*. First edition. Ankara: Sim Matbaacılık, p.110-114.
- Civan E. (1993). İstanbul Bölgesi Hayvansal Gıda İşletmelerinde Personel, Çevre ve Üretim Hijyeni. Ph.D. Thesis, İstanbul University Institute of Health Sciences, İstanbul.

- Çöl B.G, Aksu H. (2007) Gıda İşletmelerinde Ortam havasının Mikrobiyal Yüklü Üzerine Etkili Faktörler ve Hava örnekleme Teknikleri. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*. 2, 24-47.
- Doni N.Y, Gürses G, Bayraktar M, Zeyrek F.Y, Şimşek Z. (2019). Gıda çalışanlarından saptanan bağırsak parazitleri, izole edilen potansiyel patojenler ve patojenlerin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(1), 31-40.
- Dülger Ö. (2004). Hipermarketlerin ve süpermarketlerin et parçalama üniteleri ile et reyonlarında mikrobiyolojik kritik kontrol noktalarının belirlenmesi. Ph.D. Thesis, Uludağ University Institute of Health Sciences, Bursa.
- Dümen E, Çetin Ö, Sezgin F.H. (2009). Unlu mamul işletmelerinde temas yüzeyleri ve aletlerin mikrobiyolojik kirliliğinin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39(3-4), 108-114.
- Erkmen O., (2010). Gıda Kaynaklı Tehlikeler ve Güvenli Gıda Üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 53, 220-235.
- Fidan F, Ağaoğlu S. (2004). Ağrı bölgesinde bulunan lokantaların hijyenik durumu üzerine araştırmalar. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*. 15 (1), 107-114.
- FSIS (2018). Food Safety Information System. Access address: <https://ggbis.tarim.gov.tr>, Date of access:10.04.2018.
- Getie M, Abebe W, Tessema B. (2019). Prevalence of enteric bacteria and their antimicrobial susceptibility patterns among food handlers in Gondar town, Northwest Ethiopia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-6.
- Giray H, Soysal A. (2007). Türkiye'de gıda güvenliği ve mevzuatı. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(6), 485-490.
- Hampikyan H, Çolak H, Akhan M, Turgay İ. (2011). Determination of total polar compound (TPC) levels in frying oils. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 9 (2 part 1), 142-144.
- ISO (1999). International Organization of Standardization, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO Standard No. 6888-1:1999).
- ISO (2001). International Organization of Standardization, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide (ISO Standard No. 16649-1:2001).
- ISO (2006). International Organization of Standardization, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coliforms Colony-count technique. (ISO Standard No. 4832: 2006).
- ISO (2013). International Organization of Standardization, Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique (ISO Standard No. 4833-1:2013).
- ISO (2014). International Organization of Standardization, Water quality-Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO Standard No. 9308-1: 2014)
- ISO (2018). International Organization of Standardization, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs (ISO Standard No. 18593:2018).
- Kang Y. J, Frank J. F. (1989). Biological Aerosols: A review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. *Journal of Food Protection*. 52(7), 512-524.
- Konecka-Matyjek E, Mackiw E, Krygier B, Tomczuk K, Stos K, Jarosz M. (2012). National monitoring study on microbial contamination of food-contact surfaces in hospital kitchens in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19(3), 457-463.
- Kothe C.I, Schild C. H, Tondo E.C, da Silva Malheiros P. (2016). Microbiological contamination and evaluation of sanitary conditions of hot dog street vendors in Southern Brazil. *Food Control*. 62, 346-350.
- Lazou T, Georgiadis M, Pentieva K, McKeivitt A, Iossifidou E. (2012). Food Safety Knowledge and Food-Handling Practices of Greek University Students: A Questionnaire-Based Survey. *Food Control*. 28(2), 400-411.
- Lee H. K, Abdul Halim H, Thong K. L, Chai L. C. (2017). Assessment of food safety knowledge, attitude, self-reported practices, and microbiological hand hygiene of food handlers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 55.
- Legnani P, Leoni E, Berveglia M, Mirolo G, Alvaro N. (2004). Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control*. 15(3), 205-211.
- Little C, Sagoo S. (2009). Evaluation of the hygiene of ready-to-eat food preparation areas and practices in mobile food vendors in the UK. *International Journal of Environmental Health Research*. 19(6), 431-443.
- Lopašovský L, Kunová S, Bobková A, Zelenáková L, Bobko M. (2021). Control of Operational Hygiene in Fast Food Restaurants. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 28-30.
- McCarthy M, Brennan M, Kelly A.L, Ritson C, de Boer M, Thompson N. (2007). Who is at risk and what do they know? Segmenting a population on their food safety knowledge. *Food Quality and Preferences*, 18(2), 205-217.
- Mead P.S, Slutsker L, Dietz V, McCaig L.F, Bresee J.S, Shapiro C, Tauxe R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*. 5(5), 607.
- Nasrolahei M, Mirshafiee S, Kholdi S, Salehian M, Nasrolahei M. (2017). Bacterial assessment of food handlers in Sari City, Mazandaran Province, north of Iran. *Journal of infection and public health*, 10(2), 171-176.
- Paul A, Rahma M. M, Ahmed T. (2021). Identification of pathogenic bacteria from food handling surfaces (tabletops) from different areas with demonstration of their drug resistance properties. *Journal of Food Safety and Hygiene*. 5(3).
- Pitt J.I, Hocking A.D. (1999). *Fungi and Food Spoilage*. Third edition. New York: Aspen Publication, p.388.
- Paliy A.P, Rodionava K.O, Braginec M.V, Paliy A.P, Nalivayko V.I. (2018). Sanitary-hygienic evaluation of meat processing enterprises productions and their sanitation. *Ukrainian Journal of Ecology*. 8(2), 81-88.
- Ratnasari D. A, Djaja I. M, Hartono B. (2018). Analysis on Quality of Food Sanitation Hygiene and *Escherichia Coli* (*E. Coli*) Contamination at Restaurants around Commuter Line Stations in Central Jakarta, 2018. *EXECUTIVE EDITOR*, 9(12), 419.
- Sezgin A.C, and Özkaya F.D. (2014). Toplu beslenme sistemlerine genel bir bakış. *Akademik Gıda*, 12(1), 124-128.
- Temelli S, Şen M. K. C, Anar Ş. (2005). Et Parçalama Ünitelerinde ve Beyaz Peynir Üretiminde Çalışan Personel Ellerinin Hijyenik

- Durumunun Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 24 (1-2-3-4), 75-80.
- TSE (2002). Türk Standartları Enstitüsü, Su kalitesi-Bağırsak Enterokoklarının tespiti ve sayımı. Bölüm 2: Membran Süzme Yöntemi (TS EN ISO Standard No. 7899-2: 2002).
- TSE (2006). Türk Standartları Enstitüsü Kurumu, Su kalitesi - Mikrobiyolojik analizler için numune alma (TS EN ISO Standard No: 19458:2006).
- Ugur M, Nazlı B, Bostan K. (2001). *Gıda Hijyeni*. First edition. İstanbul: Teknik Basımevi, p.85-87.
- WHO (2002). World Health Organization. (2002). WHO global strategy for food safety: safer food for better health. Access address: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42559>, Date of access: 15.10.2021.
- WHO (2015). World Health Organization. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: executive summary. Access address: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>, Date of access: 15.10.2021.
- Yap M, Chau M. L., Hartantyo S. H. P, Oh J. Q, Aung, K. T, Gutierrez R. A, Ng L. C. (2019). Microbial quality and safety of sushi prepared with gloved or bare hands: Food handlers' impact on retail food hygiene and safety. *Journal of food protection*, 82(4), 615-622.
- Yoshimoto H, Zapechelnuk A. (2019). *Are There "ratatouille" Restaurants?: On Anticorrelation of Food Quality and Hygiene*. University of St Andrews. School of Economics & Finance.
- Zhang H, Lu L, Liang J, Huang Q. (2015). Knowledge, attitude and practices of food safety amongst food handlers in the coastal resort of Guangdong, China. *Food Control*, 47, 457-461.



Investigation of *mecA*, *vanA* and *pvl* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms

Muesser Yılmaz¹ , Esra Seker^{2*}

¹ Karaçoban District Directorate of Agriculture and Forestry, Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Karaçoban, Erzurum, Türkiye

² Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 16.02.2022

Abstract: This study aimed to isolate the *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis, investigate the presence of *mecA*, *vanA*, and *pvl* genes in isolated strains, and determine the resistance of *S. aureus* strains to some antibiotics commonly used in the veterinary field. In the study, 602 mammary quarter milk samples from 170 lactating cows in 40 different small-scale dairy farms in the central towns and villages of Afyonkarahisar were used. After CMT scoring, milk samples were collected aseptically from each mammary quarter. In the study, a total of 23 (3.8%) *S. aureus* strains were isolated from 602 mammary quarter milk samples by using a commercial identification kit. The *mecA*, *vanA*, and *pvl* genes were not detected in any of the strains. The phenotypic resistance of all *S. aureus* strains to 12 antibiotics was determined by using the Kirby-Bauer disc diffusion method. The highest resistance in strains was against penicillin G (52.2%), followed by oxacillin (21.7%), erythromycin (21.7%), and amoxicillin+clavulanic acid (17.4%). In conclusion, it was noted that *S. aureus* is not a prevalent pathogen in the etiology of bovine mastitis for small-scale farms where sampling was done.

Keywords: Mastitis, methicillin resistance, Panton-Valentine leukocidin, *S. aureus*, vancomycin resistance

Küçük ölçekli süt işletmelerinde siğır mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerinin araştırılması

Özet: Bu çalışmada siğır mastitislerinden *Staphylococcus aureus*'un izolasyonu, izole edilen suşlarda *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerinin varlığının araştırılması ve *S. aureus* suşlarının veteriner sahada yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotiklere dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, Afyonkarahisar'ın merkez kasaba ve köylerindeki 40 farklı küçük ölçekli süt işletmesinde bulunan 170 laktasyondaki ineğe ait 602 meme lobu süt örneği kullanıldı. CMT skorlamasının ardından, her bir meme lobundan aseptik olarak süt örnekleri toplandı. Çalışmada, ticari identifikasyon kiti kullanılarak 602 meme lobu süt örneğinden toplam 23 (%3,8) *S. aureus* suşu izole edildi. Suşların hiçbirinde *mecA*, *vanA* ve *pvl* genleri belirlenmedi. Tüm *S. aureus* suşlarının 12 antibiyotiğe karşı fenotipik dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Suşlardaki en yüksek direnç oranı penisilin G'ye (%52,2) karşı iken, bunu oksasilin (%21,7), eritromisin (%21,7) ve amoksisilin+klavulanik aside (%17,4) karşı direnç oranları izledi. Sonuç olarak, *S. aureus*'un örnekleminin yapıldığı küçük ölçekli işletmeler için siğır mastitislerinin etiyolojisinde yaygın bir patojen olmadığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Mastitis, metisilin direnci, Panton-Valentine lökositidin, *S. aureus*, vankomisin direnci

Introduction

Mastitis is a multifactorial disease that affects the quality and quantity of milk and causes great economic losses in the dairy industry. Although many microorganisms are effective in the etiology of mastitis, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) has been reported to be a common agent among bacterial mastitis pathogens by several researchers (Tenhagen et al. 2006; Igbinosa et al. 2016; Guimarães et al. 2017; Shrestha et al. 2021). Beta-lactam group antibiotics are commonly preferred in the treatment and prevention of mastitis. Methicillin resistance

in *S. aureus* is based on the synthesis of penicillin-binding protein 2a (PBP2a), a new penicillin-binding protein (PBP) with a low affinity for β -lactam group antibiotics. This resistance encoded by the *mecA* gene is considered an indicator of general resistance to β -lactams (Igbinosa et al. 2016; Foster 2017; Kakoullis et al. 2021). Vancomycin is a glycopeptide antibiotic frequently preferred for the treatment of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections in humans. After the first MRSA strain with reduced susceptibility to vancomycin was reported from Japan in 1997 (Hiramatsu et al. 1997), vancomycin-re-

sistant *S. aureus* (VRSA) strains were reported from hospitalized patients in many countries (Sievert et al. 2008; Hasan et al. 2016; Cong et al. 2020; Wu et al. 2021). However, the reports available on the detection of VRSA by using molecular methods in *S. aureus* strains isolated from animals, particularly animals with mastitis, are limited (Pehlivanoğlu and Yardımcı 2012; Bhattacharyya et al. 2016).

In various studies on the epidemiology and pathogenesis of MRSA infections, it is emphasized that Panton-Valentine leukocidin (PVL) toxin encoded by the *lukS*-PV and *lukF*-PV genes is a potential virulence factor for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) infections (Lina et al. 1999; Papanikolaou et al. 2018; Darboe et al. 2019; Amin et al. 2020; Dülger et al. 2020). Recently, with the increase in the isolation of MRSA strains from animals, an increase in studies investigating the presence of PVL toxin in these strains isolated from animals is also noteworthy (Pajić et al. 2014; Gezgen and Seker 2016; Hoque et al. 2018; Algammal et al. 2020).

Although studies investigating the prevalence of *mecA* and partially *pvl* genes in mastitis-causing *S. aureus* strains from different countries have been reported, investigations that genotypically determine vancomycin-resistance in these strains are limited. We aimed to isolate the *S. aureus* from bovine mastitis in smallholder dairy farms, investigate the presence of *mecA*, *vanA* and *pvl* genes in isolated species and determine the antibiotic resistance of strains to some antibiotics commonly used in the veterinary field.

Materials and Methods

Milk samples and *S. aureus* identification: A total of 602 mammary quarter milk samples were collected from 170 lactating cows on 40 different smallholder dairy farms located in the central towns and villages of Afyonkarahisar. No antibiotics had been applied to the animals in the previous three months. Before the sampling, the California mastitis test (CMT) was applied for each mammary quarter according to the method described by Schalm et al. (1971). Afterward, the teat ends were cleaned with 70% alcohol, dried and the first streams of foremilk were discharged. Ten milliliters of milk were collected aseptically from each quarter into sterile tubes and immediately transported to the laboratory in a cool box on ice. Ten µL of each milk sample was inoculated onto Columbia blood agar, containing 7% of sheep blood and incubated under aerobic

conditions for 24-48 h at 37°C. The intramammary infection levels for milk samples (≥ 500 cfu/mL) were determined according to the method of the National Mastitis Council (Hogan 1999). After each different colony was examined macroscopically (colony morphology, hemolysis, pigment production) and microscopically (Gram staining), and then oxidase, catalase, slide and tube coagulase, and anaerobic fermentation of glucose and mannitol tests were performed for suspected colonies (Holt et al. 2000). The certain identification of isolates was achieved using Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID kit (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). In all tests, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC® 33591 and methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) ATCC® 25923 were used as control strains (Oxoid Microbiology Products, Hampshire, UK).

Detection of 16S rDNA, *mecA*, *vanA*, and *pvl* genes in *S. aureus* strains by PCR: MRSA ATCC® 33591, *S. aureus* ATCC 49775 (*pvl* gene positive), *E. faecium* ATCC 51559 (*vanA* gene positive), and MSSA ATCC® 25923 were used as control strains (Oxoid Microbiology Products, Hampshire, UK) for PCR analysis. DNA extractions of all control strains except for *E. faecium* ATCC 51559 and test strains were performed using the boiling method (Gezgen and Seker 2016). DNA was extracted from *E. faecium* ATCC 51559 using a genomic DNA purification kit as described by the manufacturer (Thermo Scientific, Lithuania). For the detection of 16S rDNA, *mecA*, *vanA*, and *pvl* genes, the primers described by Strommenger et al. (2003), Choi et al. (2003), Dutka-Malen et al. (1995), and Lina et al. (1999) were used, respectively. While the PCR protocols previously described by Gezgen and Seker (2016) for 16S rDNA, *mecA*, and *pvl* genes were used, the protocol recommended by Dutka-Malen et al. (1995) for the *vanA* gene was applied.

Antibiotic Susceptibility Test: The antibiotic resistances of all strains determined to be *S. aureus* for 12 antimicrobial agents were tested using the Kirby-Bauer disc diffusion method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2007, 2012, 2013, 2016, 2017). The tested antibiotics were amoxicillin/clavulanic acid (30µg), enrofloxacin (5µg), cefoxitin (30µg), oxacillin (1µg), cephalothin (30µg), rifampicin (5µg), gentamicin (10µg), erythromycin (15µg), penicillin G (10U), tetracycline (30µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (25µg), and vancomycin (30µg). Positive (MRSA ATCC® 33591) and negative (MSSA ATCC® 25923) control strains were used for all applications.

Results

Isolation and identification findings: A total of 23 (3.8%) *S. aureus* strains were identified from 602 mammary quarter milk samples (355 CMT positive, 181 CMT negative, and 66 CMT suspected) belong to 170 cows by using Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID kit. The distribution of *S. aureus* strains according to CMT scores is shown in Table 1.

Detection of 16S rDNA, *mecA*, *vanA*, and *pvl* genes: According to PCR results, while all of the 23 *S. aureus* strains identified by commercial identification kit harbored the 16S rDNA gene, none of the strains carried the *mecA* gene (Figure 1). The *vanA*

and *pvl* genes were also determined in none of the strains.

Table 1. The distribution of *S. aureus* strains according to CMT scores.

CMT Score (n)	<i>S. aureus</i> (n=23)	
	n	%
+1 (163)	3	1.8
+2 (146)	13	8.9
+3 (46)	4	8.7
Negative (181)	3	1.6
Suspected (66)	-	-



Figure 1. PCR findings. M: DNA ladder (100 bp); -: *mecA* negative control strain (MSSA ATCC® 25923); +: *mecA* positive control strain (MRSA ATCC® 33591); *: sterile distilled water; lanes 1-17: 16S rDNA positive, *mecA* negative *S. aureus* test strains

Antibiotic susceptibility test findings: In tested strains, the highest resistance rate was against penicillin G (52.2%; n=12), followed by oxacillin (21.7%; n=5), erythromycin (21.7%; n=5), and amoxicillin/

clavulanic acid (17.4%; n=4). It was determined that the isolates showed a sensitivity of 95.7% against enrofloxacin and gentamicin (Table 2).

Table 2. The antibiotic resistances of *S. aureus* strains.

Antibiotic	<i>S. aureus</i> (n=23)					
	R		I		S	
	n	%	n	%	n	%
Amoxicillin/clavulanic acid (30µg)	4	17.4	-	0	19	82.6
Enrofloxacin (5µg)	1	4.3	-	0	22	95.7
Cephalothin (30µg)	3	13.0	1	4.3	19	82.7
Rifampicin (5µg)	3	13.0	-	0	20	87.0
Gentamicin (10µg)	1	4.3	-	0	22	95.7
Erythromycin (5µg)	5	21.7	12	52.2	6	26.1
Penicillin G (10U)	12	52.2	-	0	11	47.8
Tetracycline (30µg)	2	8.7	1	4.3	20	87.0
Trimethoprim/sulfamethoxazole (25µg)	3	13.0	-	0	20	87.0
Vancomycin (30µg)	3	13.0	-	0	20	87.0
Oxacillin (1µg)	5	21.7	-	0	18	78.3
Cefoxitin (30µg)	2	8.7	2	8.7	19	82.6

R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible

Discussion and Conclusion

The present study investigated the role of *S. aureus* on bovine mastitis in small-scale dairy farms and the presence of *mecA*, *vanA*, and *pvl* genes in the isolated strains.

The importance of *S. aureus* has been emphasized to be the most common pathogen in the etiology of mastitis caused by *Staphylococcus* species by several researchers, but the isolation data of this agent obtained from CMT positive bovine mastitic milk samples have shown a wide variation (between 2.6% and 52.2%) according to countries (Gezgen and Seker 2016; Igbinosa et al. 2016; Guimarães et al. 2017; Hoque et al. 2018; Algammal et al. 2020; Balemi et al. 2021; Shrestha et al. 2021). In our study, a total of 23 (3.8%) *S. aureus* strains were isolated from 602 mammary quarter milk samples belonging to 170 cows. Compared with the other researcher's results, the low isolation rate of *S. aureus* was remarkable for us. It was thought that environmental and management conditions, dairy farm type, the number of samples, isolation methods, and geographical variations may be effective on this discrepancy. Also, when we conferred with the veterinarians working in the sampling area and animal owners, they emphasized that mastitis vaccines for *S. aureus* have been included in the field applications for a long time. It was concluded that this application may also explain the low isolation rate obtained in this study. The CMT is known as an economical test that allows the approximate estimation of the somatic cell count (SCC) in milk for the diagnosis of subclinical mastitis. Although it is accepted as a general opinion that animals with a positive reaction to CMT should be approached with suspicion, it is emphasized that CMT negative animals should not be considered free from mastitis agents (Bhutto et al. 2012; Gezgen and Seker 2016). In the present study, unlike other studies, we isolated the *S. aureus* from both CMT positive (5.6%) and CMT negative (1.6%) milk samples. However, the isolation rate of *S. aureus* from CMT positive and negative mammary quarters was lower than the isolation rates reported in similar studies. The fact that this study focused only on *S. aureus* isolation, while other studies included both *S. aureus* and other *Staphylococci*, may be effective on this difference. In addition, the low number of strains obtained from our study may be another reason affecting this difference.

In various studies, the prevalence of *mecA* gene in *S. aureus* strains isolated from cows with mastitis has been reported to be between 0% and % 47 (Pu et al. 2014; Wang et al. 2015; Gezgen and Seker 2016;

Hoque et al. 2018; Algammal et al. 2020; Shrestha et al. 2021). In the present study, the *mecA* gene was determined in none of the 23 *S. aureus* strains. It was considered this result may be associated with the low number of isolated strains in our study. In this study, phenotypic resistance to methicillin was also investigated by Kirby-Bauer disc diffusion test using oxacillin and cefoxitin antibiotic discs. The resistance to oxacillin and cefoxitin was found to be 21.7% (n=5) and 8.7% (n=2), respectively. However, it was remarkable that no *mecA* gene was found in any of these phenotypically resistant strains. This finding supported the view that phenotypic resistance alone is not sufficient to determine methicillin resistance and the phenotypically methicillin-resistant strains should be also confirmed genotypically for the *mecA* gene (Wang et al. 2015).

While studies on the prevalence of VRSA in humans are widespread, investigations on the detection of vancomycin resistance genes by using molecular methods in *S. aureus* strains isolated from animals, particularly animals with mastitis, are limited (Pehlivanoglu and Yardımcı 2012; Bhattacharyya et al. 2016). Bhattacharyya et al. (2016) found phenotypic resistance to vancomycin in seven of 274 *S. aureus* strains isolated from the milk of sheep and cows with mastitis in West Bengal, India, but the *vanA* resistance gene was detected in none of the strains. Pehlivanoglu and Yardımcı (2012) from Turkey reported the *vanA* gene was not found in any of the 65 *S. aureus* strains isolated from bovine mastitic milk samples. Similarly, in our study, while 23 *S. aureus* strains were phenotypically resistant to vancomycin, none of these strains harbored the *vanA* gene. As suggested in the current resistance criteria of CLSI (2017), it was thought that phenotypic resistance determined in strains may not always be evidence of the presence of vancomycin resistance in the strain, and therefore, phenotypic resistance should be confirmed by the presence of vancomycin resistance genes.

The prevalence of the *pvl* gene encoding the Pantone-Valentine leukocidin toxin has been reported to vary between 0% and 56% in *S. aureus* isolates isolated from cows with mastitis (Zecconi et al. 2006; Türkyılmaz et al. 2010; Pajić et al. 2014; Gezgen and Seker 2016; Hoque et al. 2018; Algammal et al. 2020). Similar to findings of researchers from Turkey (Türkyılmaz et al. 2010; Gezgen and Seker 2016), none of 23 *S. aureus* strains harbored the *pvl* gene in the present study. Some authors emphasized the presence of *pvl* toxin gene are generally related to MRSA strains and this gene is more

prevalent in human clinical *S. aureus* strains (Lina et al. 1999; Darboe et al. 2019; Amin et al. 2020). This result obtained in our study may be related to the low number of isolated strains and the absence of *mecA* gene in the strains. In addition, it can be thought that PVL may not play an active role in the pathogenesis of mastitis in terms of the sampling area and sampled animals in this study.

Bacterial mastitis is among the diseases in which antibiotics are most frequently used in the veterinary field. Therefore, studies investigating the antibiotic resistance profiles of *S. aureus* isolated from the milk of animals with mastitis are quite common. Although antibiotic resistance rates obtained from these studies have shown differences, it is reported the most common phenotypic resistance profiles in the strains are against penicillin G (Tel et al. 2012; Szweda et al. 2014; Wang et al. 2015), ampicillin (Szweda et al. 2014; Shrestha et al. 2021), trimethoprim+sulfamethoxazole (Wang et al., 2015), erythromycin (Wang et al., 2015; Shrestha et al. 2021), clindamycin (Tel et al. 2012; Wang et al. 2015), and gentamicin (Wang et al. 2015; Elias et al. 2020; Shrestha et al. 2021). We investigated the antibiotic resistance of 23 *S. aureus* strains using the Kirby-Bauer disc diffusion test. According to test results, the highest resistance rate was against penicillin G (52.2%; n=12), followed by erythromycin (21.7%; n=5), oxacillin (21.7%; n=5), and amoxicillin/clavulanic acid (17.4%; n=4) (Table 2). However, the *mecA* gene was not determined in the strains showing phenotypic resistance to oxacillin and cefoxitin. When compared with the data of other researchers, it was thought that the discrepancy in resistance rates may be related to the number of strains tested, differences in the origin of the strains, and regional differences in the preference of antibiotics used in the treatment of mastitis.

As a result, it was noted that *S. aureus* was not a dominant pathogen in the etiology of bovine mastitis for the small-scale dairy farms sampled in Afyonkarahisar. In the emergence of this result, it was thought that the inclusion of mastitis vaccines against *S. aureus* among ruminant vaccinations in recent years may be effective. In the present study, the isolation of *S. aureus* was achieved from both CMT positive and CMT negative quarter milk samples. In this context, it was thought that performing microbiological identification as well as CMT applications in the diagnosis of subclinical mastitis cases may give more accurate results. Considering that there is a positive relationship between the use of non-specific antibiotics and the increase in

resistance in bacteria, it is important to select antibiotics according to the agent identification and antibiotic sensitivity test results. However, it should not be ignored that phenotypic resistance alone is not sufficient to determine resistance to methicillin and vancomycin.

Funding: This study was financially supported by the Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Grand number 17.SAG.BIL.07) and was summarized from the master thesis of the first author.

Conflict of Interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

Ethical Statement: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

References

- Algammal AM, Enany ME, El-Tarabili RM, Ghobashy MOI, Helmy YA. (2020) Prevalence, antimicrobial resistance profiles, virulence and enterotoxins-determinant genes of MRSA isolated from subclinical bovine mastitis in Egypt. *Pathogens*. 9, 362. DOI: 10.3390/pathogens9050362
- Amin DHM, Guler E, Baddal B. (2020) Prevalence of Pantone-Valentine leukocidin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates at a university hospital in Northern Cyprus: a pilot study. *BMC Res Notes*. 13, 490. DOI: 10.1186/s13104-020-05339-0
- Balemi A, Gumi B, Amenu K, Girma S, Gebru M, Tekle M, Rius AA, D'Souza DH, Agga GE, Kerro Dego O. (2021) Prevalence of mastitis and antibiotic resistance of bacterial isolates from CMT positive milk samples obtained from dairy cows, camels, and goats in two pastoral districts in Southern Ethiopia. *Animals (Basel)*. 11, 1530. DOI: 10.3390/ani11061530
- Bhattacharyya D, Banerjee J, Bandyopadhyay S, Mondal B, Nanda PK, Samanta I, Mahanti A, Das AK, Das G, Dandapat P, Bandyopadhyay S. (2016) First report vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microb Drug Resist*. 22: 675-681. DOI: 10.1089/mdr.2015.0330
- Bhutto AL, Murray RD, Woldehiwet Z. (2012) California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Res Vet Sci*. 92, 13-17. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.10.006
- Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. (2003) Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci*. 18, 631-636. DOI: 10.3346/jkms.2003.18.5.631
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI Document M100-S17. Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI Document M100-S22. Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013) Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty. CLSI Document M100-S26. Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty. CLSI Document M100-S27. Wayne, PA.
- Cong Y, Yang S, Rao X (2020) Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res.* 21, 169-176. DOI: 10.1016/j.jare.2019.10.005
- Darboe S, Dobreniecki S, Jarju S, Jallow M, Mohammed NI, Wathuo M, Ceesay B, Tweed S, Basu Roy R, Okomo U, Kwambana-Adams B, Antonio M, Bradbury RS, de Silva TI, Forrest K, Roca A, Lawal BJ, Nwakanma D, Secka O. (2019) Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and antimicrobial resistance in community-acquired clinical *Staphylococcus aureus* in an Urban Gambian Hospital: A 11-year period retrospective pilot study. *Front Cell Infect Microbiol.* 9, 170. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00170
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 33, 24-27 (Erratum 33:1434). DOI: 10.1128/jcm.33.5.1434-1434.1995.
- Dülger D, Ekici S, Albuz Ö, Pakdemirli A. (2020). Investigation of nasal *Staphylococcus aureus* carriage in hospital employees and rapid detection of PVL and *mecA* genes by RT-PCR. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 31, 47-51. DOI: 10.35864/evmd.731631
- Elias L, Balasubramanyam AS, Ayshpur OY, Mushtuk IU, Sheremet NO, Gumeniuk VV, Musser JMB, Rogovskyy AS. (2020) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Ukraine. *Antibiotics.* 9, 469. DOI:10.3390/antibiotics9080469
- Foster TJ. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 41, 430-449. DOI: 10.1093/femsre/fux007
- Gezgen C, Seker E. (2016) Investigation of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin in staphylococci isolated from bovine mastitis. *Acta Sci Vet.* 44, 1373. DOI: 10.22456/1679-9216.81080
- Guimarães FF, Manzi MP, Joaquim SF, Richini-Pereira VB, Langoni H. (2017) Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. *J Dairy Sci.* 100, 726-730. DOI: 10.3168/jds.2016-11700
- Hasan R, Acharjee M, Noor R. (2016) Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. *Tzu Chi Med J.* 28, 49-53. DOI: 10.1016/j.tcmj.2016.03.002
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 40, 135-146. DOI: 10.1093/jac/40.1.135
- Hogan JS. (1999) *Laboratory handbook on bovine mastitis*. Revised edition. Madison, WI: National Mastitis Council Inc., p. 222.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. (2000) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 787.
- Hoque MN, Das ZC, Rahman ANMA, Haider MG, Islam MA. (2018) Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *Int J Vet Sci Med.* 6, 53-60. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.03.008
- Igbinsola EO, Beshiru A, Akporehe LU, Ogofure AG. (2016) Detection of methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from food producing animals: A public health implication. *Vet Sci.* 3, 14. DOI: 10.3390/vetsci3030014.
- Kakoulis L, Papachristodoulou E, Chra P, Panos G. (2021) Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-positive and Gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics.* 10, 415. DOI: 10.3390/antibiotics10040415
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 29, 1128-1132. DOI: 10.1086/313461.
- Pajić MJ, Rašić ZB, Velebit BM, Boboš F, Mihajlović-Ukropina MM, Radinović MŽ, Galfi AL, Petković JM, Trojačanec SI. (2014) The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin. *Vet Arhiv.* 84, 205-214.
- Papanikolaou A, Kotsifas K, Balis E. (2018) Community acquired pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *Med Res Arch.* 6, 1-10.
- Pehlivanoğlu F, Yardımcı H. (2012) Detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine milk samples with mastitis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 18: 849-855.
- Pu W, Su Y, Li J, Li C, Yang Z, Deng H, Ni C. (2014) High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS One.* 9, e88134. DOI: 10.1371/journal.pone.0088134
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. (1971) *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea&Febiger, pp. 136-157.
- Shrestha A, Bhattarai RK, Luitel H, Karki S, Basnet HB. (2021) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and pattern of antimicrobial resistance in mastitis milk of cattle in Chitwan, Nepal. *BMC Vet Res.* 17, 239. DOI: 10.1186/s12917-021-02942-6
- Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. (2008) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis.* 46, 668-674. DOI: 10.1086/527392
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 41, 4089-4094. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003
- Szweda P, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. (2014) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *J Vet Med Sci.* 76, 355-362. DOI: 10.1292/jvms.13-0177
- Tel OY, Bayraktar M, Keskin O. (2012) Investigation of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus* strains of human and bovine origin. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 59, 191-196. DOI: 10.1501/Vetfak_00000002524
- Tenhagen B-A, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. (2006) Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 89, 2542-2551. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X
- Türkylmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B. (2010) Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health.* 57, 197-203. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01257.x
- Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T, Li J, Lv Y, Han B. (2015) Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infect Genet Evol.* 31, 9-16. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.12.039
- Wu Q, Sabokroo N, Wang Y, Hashemian M, Karamollahi S, Kouhsari E (2021) Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Resist Infect Control.* 10, 101. DOI: 10.1186/s13756-021-00967-y
- Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. (2006) Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog.* 40, 177-183. DOI: 10.1016/j.micpath.2006.01.001



Agents isolated from horses with respiratory system infection signs

Ayşe Ebru Borum^{1*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Balıkesir University, Balıkesir, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 14.03.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 08.06.2022

Abstract: In this study, it was aimed to isolate the agents and to determine the antibiotic susceptibility of the agents by taking nasal swabs from horses with respiratory system problems. Nasal swab samples were taken from 30 horses of different age groups with respiratory system symptoms in South Marmara Region. The samples were cultured on Blood agar, MacConkey agar, Mycoplasma agar and, Sabouraud Dextrose agar. Colony morphology, gram staining and biochemical tests were performed for identification. Disk diffusion method was used to determine the antimicrobial susceptibility of the agents. Ten different microorganism species were isolated from nasal swabs taken from horses of different ages with respiratory system problems. As a result of the biochemical tests, 9 *Streptococcus zooepidemicus* (27.27%), 4 *Staphylococcus aureus* (12.12%), 4 Coagulase-negative staphylococci (CoNS) (12.12%), 4 *Klebsiella pneumoniae* (12.12%), 3 *Pasteurella* spp. (9.09%), 2 *Streptococcus pyogenes* (6.06%), 2 *Bacillus* spp. (6.06%), 2 *Corynebacterium* spp. (6.06%), 2 *Candida* spp. (6.06%) and 1 *Rhodococcus equi* (3.03%) were identified. The most *Streptococcus zooepidemicus* (27.27%) and the least *Rhodococcus equi* (3.03%) were identified from nasal swab samples. The most sensitive antibiotic of the isolates was Amoxicillin / clavulanic acid (96.87%), and the most resistant was Penicillin-G (18.75%).

Keywords: Antibioqram test, bacteria, fungi, horse, nasal swab, respiratory diseases

Solunum sistemi enfeksiyon semptomlu atlardan izole edilen etkenler

Özet: Bu çalışmada solunum sistemi sorunu olan atlardan nasal svaplar alınarak etkenlerin izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Güney Marmara Bölgesi'nde solunum sistemi semptomları olan farklı yaş gruplarındaki 30 attan nasal svap örnekleri alındı. Örnekler Blood agar, MacConkey agar, Mycoplasma agar ve Sabouraud Dextrose agarda kültüre edildi. İdentifikasyon için koloni morfolojisi incelemesi, gram boyama ve biyokimyasal testler yapıldı. Etkenlerin antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Solunum sistemi sorunları olan farklı yaşlardaki atlardan alınan nasal svaplardan 10 farklı mikroorganizma türü izole edildi. Biyokimyasal testler sonucunda 9 *Streptococcus zooepidemicus* (%27,27), 4 *Staphylococcus aureus* (%12,12), 4 Koagülaz negatif stafilokok (KNS) (%12,12), 4 *Klebsiella pneumoniae* (%12,12), 3 *Pasteurella* spp. (%9.09), 2 *Streptococcus pyogenes* (%6.06), 2 *Bacillus* spp. (%6.06), 2 *Corynebacterium* spp. (%6.06), 2 *Candida* spp. (%6.06) ve 1 *Rhodococcus equi* (%3.03) tespit edildi. Nasal svap örneklerinden en fazla *Streptococcus zooepidemicus* (%27.27) ve en az *Rhodococcus equi* (%3.03) izole edildi. İzolatların en duyarlı olduğu antibiyotik Amoksisilin/klavulanik asit (%96.87), en dirençli olduğu ise Penisilin-G (%18.75) idi.

Anahtar Kelimeler: Antibioqram test, bacteria, fungi, horse, nasal swab, respiratory diseases

Introduction

Respiratory problems are among the most important disorders that limit the athletic performance of horses. For this reason, early detection of respiratory problems, adequate and appropriate treatment is very important, especially in race horses, to maximize the chances of recovery, to reduce economic losses and performance losses (Van Erck-Westergren et al. 2013). Infectious agents cause clinical and subclinical respiratory problems in horses. Environmental factors play a very important role in the development of respiratory diseases. Horses housed indoors are exposed to high levels of organic dust, including bacteria and fungi. Materials such as straw and straw naturally contain an important native mi-

croflora that can grow further when stored or used as feed or bedding (Carvalho et al. 2017). In addition, respiratory system infections are an important cause of death in foals (Vitale et al. 2019). Generally, viral and bacterial upper respiratory tract infections occur in foals aged 1, inflammatory respiratory tract disease and pleuropneumonia occur in race horses aged 2 or more. Respiratory tract neoplasms generally occur in horses 5 years and older (Ainsworth et al. 2010).

Respiratory infection causes significant economic losses, especially for young performance horses (Dyson et al. 2008). Infectious diseases affecting the upper and lower respiratory tract of horses are common (Gilkerson et al. 2015). These

are usually associated with pathogenic bacterial invasions (Reuss and Giguère 2015), viral infections (Singh et al. 2018), and rarely fungal agents (Stewart and Cuming 2015). In respiratory system infections in horses; *Rhodococcus equi* (*R. equi*), *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi* subsp. *equi*), *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. equi* subsp. *zooepidemicus*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) and *Mycoplasma* spp. (Chapman et al. 2000; Christley et al. 2001; Wood et al 2005; Couetil et al 2016; Kasap et al 2018; Pusterla et al 2020; Nehal et al. 2021) isolated. *S. equi* subsp. *zooepidemicus* is a normal commensal of healthy horses. However, it is an important opportunistic pathogen in respiratory tract infections in foals and horses due to exercise, temperature, transport or viral infections (Velineni et al. 2014).

Viral pathogens such as Equine herpes virus (EHV), Equine Influenza (EI), Equine Viral Arteritis (EVA) and Equine Rhinovirus A (ERAV) and B (ERBV) (Ainsworth and Cheetham 2010, Laing et al 2020) and fungal pathogens such as *Blastomyces* spp., *Histoplasma* spp., *Cryptococcus* spp., *Coccidioides* spp. and *Candida* spp. are also important for the respiratory system (Cordeiro et al. 2013; Stewart and Cuming 2015). These agents may cause infection alone or may cause mixed infection (Kulkarni et al. 2019).

Although clinical findings show differences, exercise intolerance, cough, runny nose, fever, respiratory problems, increased respiratory effort, general depression, anorexia, lethargy and weight loss can be observed (Couetil et al. 2016).

Pneumonia cases in adult horses mostly develop as a result of bacteria aspirated from the environment, nose or oropharynx reaching the lower respiratory tract and suppression of pulmonary defense mechanisms. Numerous opportunistic pathogens have been isolated in cases of pneumonia in horses, and mixed aerobic and anaerobic bacteria are present in many cases (Reuss and Giguère 2015). In race horses, pneumonia most commonly occurs in association with aerobic bacteria that form one or more microflora of the upper respiratory tract mucosa (Chapman et al. 2000). Opportunistic respiratory pathogens frequently isolated in cases of pneumonia are *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Pasteurella* spp. and *Bordetella bronchiseptica*, but *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are also commonly detected in respiratory tract samples (Fonseca et al 2020).

Although some fungal species are accepted as primary agents of respiratory tract infections in many mammals and the nasal cavity is important for the colonization of fungal species, research on mycotic agents in respiratory infections of horses is limited. *Candida* spp., as an opportunistic pathogen, causes many infections in adult horses and foals (Riley et al. 1992; Reilly and Palmer 1994; Stewart and Cuming 2015, Dauvillier et al 2018).

Cytological examination of respiratory tract samples and bacterial culture are useful and reliable methods for diagnosing these infections, determining their etiology and determining the appropriate antibiotic treatment (Sweeney et al. 2005; Reuss and Giguère 2015). It is important to correctly identify and diagnose bacterial respiratory tract infections. Because correct and effective treatment can be performed by using antimicrobials suitable for the agents isolated and identified according to the laboratory results (Wilson 2001; Morley et al. 2005; Bowen 2013).

In cases where respiratory system infections are suspected in horses, agent isolation and antibiogram tests are generally not used. Empirical therapy is usually initiated when a bacterial infection is suspected (Christley et al. 2000). Empirical treatment may cause deterioration of prognosis, increase in clinical findings and antibiotic resistance. It is very important to perform antibiogram tests in respiratory system infections of horses in order to obtain more successful results from the treatment. Proper selection of antibiotics; It shortens the treatment time and provides a good prognosis. It also reduces the cost of treatment and prevents antibiotic resistance that will occur as a result of unnecessary antibiotic use.

The aim of this study is to isolate bacterial and fungal agents from nasal swabs taken from horses showing signs of respiratory system infection and to determine the antibiogram sensitivity of the isolated bacterial agents.

Material and Methods

Samples

Thirty nasal swab samples were taken from 30 race horses aged 3 months to 4 years with clinical findings such as nasal discharge, anorexia and cough. Nasal swabs were advanced deeply (> 30 cm) into the ventral nasal concha. Swabs were placed into a semi-solid Amies transport medium. Swabs were delivered to the laboratory by providing a cold chain.

Bacteriological examination

Nasal swabs were incubated in nutrient broth (Oxoid, CM0001B) at 37°C for 8-12 hours under aerobic conditions (Broux et al. 2016; Espindola et al. 2022). Blood Agar No.2 with 5% defibrinated sheep blood (Oxoid, CM0271), MacConkey Agar (Oxoid, CM0007), Mycoplasma Agar (Oxoid, CM0401) were used for bacterial isolations. Samples were incubated at 37°C for 1-5 days under microaerophilic and aerobic conditions. Growing colonies were examined according to colony morphology and hemolysis characteristics. In addition, Gram staining was performed and evaluated according to their staining properties and microscopic morphology. Pure cultures were prepared and identified by routine biochemical tests. Biochemical tests for oxidation/fermentation, coagulase, catalase, cytochrome oxidase, urease and indole production were applied for identification. Bile solubility and optochin susceptibility tests were performed to identify *S. pneumoniae*. Trehalose and Sorbitol utilization tests were performed to distinguish among *S. equi* and *S. zooepidemicus*. Colonies suspected to be *R. equi* were subcultured and identified by colony morphology, Gram stain, biochemical tests and CAMP test. Bacterial identification was performed using standard API 20E (REF 20160), API20 NE (REF 20050), API Staph (REF 20500), API Strep (REF 20600), API Coryne kits (REF 20600) (BioMerieux).

Fungal examination

All samples were cultured on Sabouraud dextrose agar with Chloramphenicol (Oxoid, CM41). It was incubated at 25°C for 2-4 weeks. In addition, Brain heart infusion agar (Oxoid, CM1136B) containing 0.05 mg/ml of Chloramphenicol (Oxoid, SR0078) and Cycloheximide (1%) (Oxoid, SR0222C) was used. Cultures were incubated at 37°C for 2-4 weeks and examined every 3 days for the presence of fungal organisms.

Fungal colonies were evaluated according to their macroscopic properties. The shape, texture and color of fungal colonies in SDA and BHIA were examined. In addition, the microscopic properties of were stained with lactophenol cotton blue. Fungal colonies were identified according to their macroscopic and microscopic features.

Antibiogram test

Kirby-Bauer Disk Diffusion were used to determine antibacterial susceptibility. It was performed on Mueller-Hinton agar using the standard disk diffusion method, equivalent to the 0.5 McFarland turbidity standard. Testing and evaluation were done

according to the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Anonymous 2002; CLSI 2017).

Commercially available antibiotic discs (Oxoid) were used in the study. These discs; Gentamicin (10 µg), Cephazolin (30 µg), Erythromycin (10 µg), Oxytetracycline (30 µg), Streptomycin (10 µg), Amoxycilin / Clavulanic acid (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Penicillin-G (10 U), Ampicillin / Sulbactam (30 µg) and Trimethoprim / Sulfamethoxazole (25 µg).

All collected clinical samples were inoculated into the brain hearth infusion broth and incubated at 37°C until the turbidity reached the 0.5 McFarlands standard. The inoculum was spread over the entire surface of the medium of Mueller-Hilton agar with a drigalski spatula and left for 10-15 minutes. Antibiotic discs were placed under aseptic conditions using sterile forceps. Plates were then incubated at 37°C for 14-18 hours. After incubation, inhibition zone diameters were measured in millimeters and standard zone diameters were compared with the standards specified by the "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" and evaluated as "susceptible" or "resistant" according to results.

Results

Bacterial isolation and identification

As a result of the examination performed from nasal swabs taken from 30 horses between 3 months and 4 years of age, showing signs of nasal discharge and cough, 9 different bacterial species and 1 yeast species were isolated (Table 1). Two different bacteria were isolated as mixed culture from two nasal swabs, and one species of bacteria was isolated from 28 as pure culture.

Table 1. Bacterial and fungal species isolated from nasal swabs

Microorganism	Number of isolates (%)
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	9 (26.47)
Coagulase-negative staphylococci (CoNS)	5 (14.70)
<i>S. aureus</i>	4 (11.76)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (11.76)
<i>Pasteurella</i> spp.	3 (8.82)
<i>Bacillus</i> spp.	2 (5.88)
<i>S. pyogenes</i>	2 (5.88)
<i>Corynebacterium</i> spp.	2 (5.88)
<i>R. equi</i>	1 (2.94)
<i>Candida</i> spp.	2 (5.88)
Total	34 (100)

The distribution of isolated factors according to age groups is presented in Table 2.

R. equi was isolated from a 4 month old foal. Fifteen different agents were isolated from the foals in the 3-12 months age group, and 18 different agents were isolated from the horses and foals in the 2-4 age group. More species of bacteria have been isolated from horses and foals over 2 years of age. *Candida* spp. was isolated from animals aged 2-4 years.

The distribution of isolated agents by age groups is presented in Table 2.

Table 2. Distribution of isolated agents by age groups.

Age Groups	Species	Number of isolates	Total
3-6 months	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	2	7
	<i>S. aureus</i>	1	
	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i>	2	
	<i>Pasteurella</i> spp.	1	
	<i>R. equi</i>	1	
6-12 months	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	2	9
	<i>S. aureus</i>	1	
	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i>	3	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	
	<i>Bacillus</i> spp.	1	
2-4 years	<i>Corynebacterium</i> spp.	1	18
	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	5	
	<i>S. aureus</i>	2	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	
	<i>Pasteurella</i> spp.	2	
	<i>Bacillus</i> spp.	1	
	<i>S. pyogenes</i>	2	
	<i>Corynebacterium</i> spp.	1	
	<i>Candida</i> spp.	2	

Antibiogram test

Amoxycilin / Clavulanic acid and Ampicillin / Sulbactam were determined as the antibiotics to which the agents were most sensitive, Penicillin-G was the antibiotic to which the isolated agents were most resistant. The results are shown in Table 3.

Streptococcus spp. was found to be highly sensitive to Amoxycilin / Clavulanic acid (30 µg), Ampicillin / Sulbactam (30 µg) and Trimethoprim / Sulfamethoxazole (25 µg). *Staphylococcus* spp. was more sensitive to Amoxycilin / Clavulanic acid (30 µg), Ampicillin / Sulbactam (30 µg) and Enrofloxacin (5 µg). Other isolated agents were generally susceptible to Amoxycilin / Clavulanic acid and Ampicillin / Sulbactam. The results are shown in Table 4.

Table 3. Antibiotic sensitivity/resistance of agents

Antibiotic	Sensitivity (%)	Resistance (%)
Amoxycilin/Clavulanic acid	96.87	3.12
Ampicillin/Sulbactam	93.75	6.25
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	87.50	12.50
Enrofloxacin	84.37	15.62
Oxytetracycline	84.37	15.62
Cephazolin	65.62	34.37
Gentamisin	53.12	46.87
Erythromycin	37.50	62.50
Streptomycin	34.37	65.62
Penicillin-G	18.75	81.25

Table 4. Antibiotic susceptibility of isolated bacterial strains

Antibiotic	Sensitivity-S / Resistance R (%)	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	<i>S. aureus</i>	Coagulase negative <i>Staphylococci</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>S. pyogenes</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>R. equi</i>
Gentamisin	S/R	66.66/33.33	25/75	80/20	50/50	66.66/33.33	50/50	0/100	50/50	0/100
Cephazolin	S/R	44.44/55.55	75/25	100/0	75/25	33.33/66.66	100/0	0/100	100/0	100/0
Erythromycin	S/R	11.11/88.88	50/50	80/20	25/75	33.33/66.66	50/50	0/100	100/0	0/100
Oxytetracycline	S/R	77.77/22.22	75/25	100/0	75/25	100/0	50/50	100/0	100/0	100/0
Streptomycin	S/R	22.22 /77.77	25/75	60/40	25/75	33.33/66.66	50/50	50/50	50/50	0/100
Amoxycilin/Clavulanic acid	S/R	88.88/11.11	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0
Enrofloxacin	S/R	66.66/33.33	100/0	100/0	75/25	100/0	100/0	50/50	100/0	100/0
Penicillin-G	S/R	0/100	25/75	20/80	25/75	33.33/66.66	50/50	0/100	50/50	0/100
Ampicillin/Sulbactam	S/R	88.88/11.11	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0	50/50	100/0	100/0
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	S/R	88.88/11.11	75/25	100/0	75/25	100/0	100/0	100/0	50/50	100/0

Discussion and conclusion

Respiratory diseases have been reported to be among the most common diseases in horse breeding in countries around the world (Sharma et al 2017; Kasap et al 2018; Vitale et al 2019). In particular, unsuitable shelter conditions, crowded environments and unfavorable climatic conditions increase the exposure of horses to different respiratory pathogens (Wood et al 2005).

S. zooepidemicus, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. bronchiseptica* and *Enterobacter* spp. are the most isolated bacterial respiratory pathogens from horses. *Str. zooepidemicus* is the most frequently isolated bacteria (Chapman et al 2000; Bianchi et al 2018; Kasap et al 2018; Preziuso et al 2019; Bianchi et al 2020). In a study conducted by Broux et al (2016), nasal swabs taken from 103 horses showing signs of respiratory system infection were found to be 30% *S. equi* subsp. *zooepidemicus* has been isolated (Broux et al. 2016). In a study of racehorses with pleuropneumonia, bronchopneumonia, embolic pneumonia and pleuritis, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 72%, *Pasteurella* spp. 5%, *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus* spp. 4% were isolated. (Carvalho et al. 2017). In nasopharyngeal swabs taken from horses with acute respiratory problems, 45.7% coagulase negative *Staphylococcus* spp., 18.5% *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and 3.3% coagulase positive *Staphylococcus* spp. were isolated (Carman et al. 1997). *S. equi* subsp. *zooepidemicus* is an opportunistic pathogen of the upper respiratory tract. (Christley et al 2001; Pusterla et al 2020). In another study, *R. equi* was isolated in 10 of nasal swap samples taken from 1010 horses (Gressler et al 2018). In a study conducted by Fonseca et al (2020), the highest rate of isolated *S. zooepidemicus* was 22.9%. Other agents isolated from the upper respiratory tract of horses were found as *S. equi* (14.1%), *E. coli* (17.5%), coagulase-negative *staphylococci* (17.3%), respectively. Bianchi et al. (2018) examined 50 lungs with bronchopneumonia and identified *S. zooepidemicus* in 21 of them. *S. zooepidemicus* (27.4%) and *E. coli* (15.6%) were isolated primarily from racehorses with lower respiratory tract disorders (Kasap et al. 2018). In our study, *S. zooepidemicus* was the agent with the highest rate with 27.27%, and then, coagulase negative *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp. and *S. aureus* were isolated in 12.12%.

The agents and isolation rates in our study were similar to those in other studies. *R. equi* is one of the most important causes of pneumonia in foals

between 1 and 6 months of age. *R. equi* infection is usually characterized by an acute respiratory problem in foals followed by death within a few hours or days. Therefore, accurate and early diagnosis of *R. equi* infection is important. In a study conducted in northern Brazil, *R. equi* was detected in all cases of pyogranulomatous pneumonia in young foals. (Bianci et al. 2020).

In a study, it was reported that *Candida* spp. was isolated from 35 nasal swabs from 97 horses (Cordeiro et al. 2013). *Penicillium* spp. (53%), *Aspergillus* spp. (34%), *Rhizomucor* spp. (5%), and *Candida* spp. (5%) were isolated from horses with respiratory infection (Dauvillier et al. 2019). In this study, only 2 *Candida* spp. (6.06%) were isolated. It has been reported that fungal spores in stored hay, which are used as feed and bedding in respiratory system infections, may cause mycotic respiratory infections in horses by alveolar inhalation. Fungal agents in the respiratory system can have infective, toxic, allergic or a combination of all three effects (Dauvillier et al. 2019).

In a study examining the antibacterial susceptibilities of agents isolated in respiratory system infections in horses, it was reported that *Staphylococcus* spp. was sensitive to Ceftifour, Enrofloxacin, Gentamicin and Tetracyclines at a rate of 81.5% to 97.5%, and to Penicillin at a lower rate (57.1%). *Streptococcus* spp. isolated in the study was found to be susceptible to Ceftifour, Enrofloxacin, Gentamicin and Penicillin at a rate of 80% -97% and Tetracycline at a rate of 59% (Toombs-Ruane et al. 2015). In a study, *R. equi* was found to be sensitive to streptomycin, erythromycin, neomycin, norfloxacin, amoxicillin and sulfadiazine. It was determined that the isolated *Staphylococcus* species were sensitive to ampicillin, amoxicillin, neomycin, doxycycline, gentamicin, oxytetracycline erythromycin and streptomycin (Sharma et al., 2017). In another study, all isolates of β -hemolytic, group C *Streptococci* were found susceptible to Ceftiofur and Erythromycin, but especially lower respiratory tract sample isolates were found resistant to Tetracycline (*S. equi* subsp. *zooepidemicus* more than 90% and *S. equi* subsp. *equi* 66.7%) (Fonseca et al. 2020). It was determined that all *S. zooepidemicus* (100%) were susceptible to ceftaxime, meropenem and doxycycline.

In our study, similar results were obtained with other studies. Our isolates were highly susceptible to Amoxycilin / Clavulanic acid, Ampicillin / Sulbactam, Trimethoprim / Sulfamethoxazole, Enrofloxacin and Oxytetracycline. Tetracyclines are recommended as alternative agents for the treatment of upper

respiratory tract infections in horses (British Equine Veterinary 2016). In this study, we found oxytetracycline effective.

The use of antibiotics for the treatment of respiratory infections in horses remains controversial. Studies on effective and correct use of antibiotics in respiratory system infections of horses are not sufficient. There is a need for prospective studies that monitor horses with and without antibiotic therapy. Antibiotic resistance is quite common in bacterial agents of infectious respiratory infections in horses. In addition, it can have serious effects such as higher morbidity and mortality due to treatment failure and increase treatment costs. In recent years, empirical and inexpensive antibiotic application studies in respiratory system infections in horses have led to the development of resistance against the antibiotics used, prolonging the treatment and increasing the cost. In order to prevent these negative results, it will be more appropriate to isolate your agent and perform an antibiogram test.

Respiratory system infections cause serious performance losses especially in race horses. The causative agents of infection should be identified correctly. In addition, accurate and effective antibiotics should be determined for the agent isolated by antibiotic susceptibility tests. Incorrect and ineffective antibiotic administration adversely affects the prognosis of infection in horses and causes performance losses. In addition, it causes the progression of the infection and prolongation of the treatment period by causing antibiotic resistance. By taking a nasal swab, rapid agent identification can be done without causing pain to the animal and without the need for anesthesia.

Financial Resource: During this study, any pharmaceutical company that has a direct connection with the subject of the research, a company that provides and/or produces medical instruments, equipment and materials, or any commercial company, or any moral support.

Ethical statement: This study is not subject to HADYEK permission according to Article 8 (k) of the "Regulation on the Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethical Committees".

References

- Ainsworth DM, Cheetham J. (2010) Disorders of the respiratory disease. Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. eds. *Equine Internal Medicine*, 3th edition, Saunders Elsevier, St. Louis, p. 290 – 371.
- Anonymous. (2002) Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard 2nd ed. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards M31-A2.
- Bianchi MV, Mello LS, Lorenzo CD, Lopes BC, Snel GGM, Driemeier D, Pavarini SP. (2018) Lung lesions of slaughtered horses in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 38(11):2056-2064.
- Bianchi MV, Mello LS, Ribeiro PR, Wentz MF, Stolf AS, Lopes BC, de Andrade CP, Snel GGM, Sonne L, Driemeier DS, Pavarini SP. (2020) Causes and Pathology of Equine Pneumonia and Pleuritis in Southern Brazil. *J Comp Pathol.* 179: 65-73.
- Bowen M. (2013) Antimicrobial stewardship: Time for change. *Equine Vet J.* 45, 127–129.
- British Equine Veterinary. Protect Me - Practice policy. (2016) Available: <https://www.beva.org.uk/Portals/0/Documents/Resources/1beva-antimicrobial-policy-templatedistributed.pdf>.
- Broux B, Gryspeerdt A, Amory H, Fripiat T, Pardon B, Gasthuys F, Legrand L, Deprez P. (2016) Prevalence of respiratory pathogens in nasal swabs from horses with acute respiratory disease in Belgium. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr.* 85, 221–224.
- Carman S, Rosendal S, Huber L, Gyles C, McKee S, Willoughby RA, Dubovi E, Thorsen J, Lein D. (1997) Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *J Vet Diagn Invest.* 9, 17–23.
- Carvalho FR, Uzal FA, Diab SS, Hill AE, Arthur RM. (2017) Retrospective study of fatal pneumonia in racehorses. *J Vet Diagn Invest.* 29, 450–456.
- Chapman PS, Green C, Main JP, Taylor PM, Cunningham FM, Cook AJ, Marr CM. (2000) Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet Rec.* 146, 91–95.
- Christley RM, Rose RJ, Hodgson DR, Reid SW, Evans S, Bailey C, Hodgson JL. (2000) Attitudes of Australian veterinarians about the cause and treatment of lower-respiratory-tract disease in racehorses. *Prev Vet Med.* 46, 149–159.
- Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Wood JL, Reids SW, Whitear KG, Hodgson JL. (2001) A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J.* 33, 256–264.
- Cordeiro Rde A, Bittencourt PV, Brilhante RS, Teixeira CE, Marques FJ, Bittencourt PV, Carvalho VL, Bandeira T, Brilhante RS, Moreira JL, Pereira-Neto W, Sidrim JJ, Rocha, MF. (2013) Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Med Mycol.* 51, 731–736.
- Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R, Richard EA. (2016) Inflammatory Airway Disease of Horses-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 30, 503–515.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S26, 27th ed, p. 32, 52, 54.
- Dauvillier J, Ter Woort F, van Erck-Westergren E. (2019) Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 33, 968–975.
- Dyson PK, Jackson BF, Pfeiffer DU, Price JS. (2008) Days lost from training by two- and three-year-old thoroughbred horses: A survey of seven UK training yards. *Equine Vet J.* 40, 650–657.
- Espíndola JP, Machado G, Diehl GN, Dos Santos LC, De Vargas AC, Gressler GT. (2022) Culturable microbial population from the upper respiratory tract of 1,010 clinically healthy

- horses in Southern Brazil, *J Equine Vet Sci.* doi:<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103946> Fonseca JD, Mavrides DE, Morgan AL, Na JG, Graham PA, McHugh TD. (2020) Antibiotic resistance in bacteria associated with equine respiratory disease in the United Kingdom. *Vet Rec.* 187, 189.
- Gilkerson JR, Bailey KE, Diaz-Méndez A, Hartley CA. (2015) Update on viral diseases of the equine respiratory tract. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 33, 91-104.
- Gressler LT, Machado G, da Silveira BP, Cohen ND, Corbellini LG, Leotti VB, Diehl GN, Dos Santos LC, de Vargas AC. (2018) Prevalence of *Rhodococcus equi* from the nasal cavity of 1010 apparently healthy horses. *Equine Vet J.* 50, 667-671.
- Kasap S, Kennerman E, Göçmen H, Cihan H, Ulgen M. (2018) Results of cytological and microbiological examination using tracheal aspiration in race horses with lower respiratory tract disease. *Acta Vet Brno.* 87: 339-345.
- Kulkarni MB, Deshmukh SS, Agiwal SM, Awandkar SP. (2019) Antibigram of pathogens from nasal affections in equine. *INTAS POLIVET.* 20, 385-389.
- Laing G, Christley R, Stringer A, Ashine T, Cian F, Aklilu N, Newton R, Radford A, Pinchbeck G. (2021) Pathology, infectious agents and horse- and management-level risk factors associated with signs of respiratory disease in Ethiopian working horses. *Equine Vet J.* 53, 670-681.
- Morley PS, Apley MD, Besser TE, Burney DP, Fedorka-Cray PJ, Papich MG, Traub-Dargatz JL, Weese JS, American College of Veterinary Internal Medicine (2005) Antimicrobial drug use in veterinary medicine. *J Vet Intern Med.* 19, 617-629.
- Nehal MF, Kamelia MO, Azza NF, Shaimaa RAAE, Soumaya SAES, Shahein MA, Ibraheem EM (2021). Phenotypic Study on the Bacterial Isolates from Equine with Respiratory Disorders regarding Antimicrobial Drug Resistance. *World Vet J.* 11(1), 98-109.
- Prezioso S, Moriconi M, Cuteri V. (2019) Genetic diversity of *Streptococcus equi* subsp. zooepidemicus isolated from horses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 65, 7-13.
- Pusterla N, Rice M, Henry T, Barnum S, James K. (2020). Investigation of the Shedding of Selected Respiratory Pathogens in Healthy Horses Presented for Routine Dental Care. *J Vet Dent.* 37(2), 88-93.
- Reilly LK, Palmer JE. (1994) Systemic candidiasis in four foals. *J Am Vet Med Assoc.* 205, 464-466.
- Reuss SM, Giguère S. (2015) Update on bacterial pneumonia and pleuropneumonia in the adult horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 31, 105-120.
- Riley CB, Yovich JV, Robertson JP, O'Hara FL. (1992) Fungal arthritis due to infection by *Candida famata* in a horse. *Aust Vet J.* 69, 65-66.
- Sharma AK, Randhawa CS, Narang A, Sood NK, Rai TS. (2017). Cytological and Bacteriological Evaluation of Tracheal Aspirates for the Diagnosis of Lung Affections in Horses. *J Anim Res.* 7(3); 759-464.
- Singh RK, Dhama K, Karthik K, Khandia R, Munjal A, Khurana SK, Chakraborty S, Malik, YS, Virmani N, Singh R, Tripathi BN, Munir M, van der Kolk JH. (2018) A comprehensive review on equine influenza virus: etiology, epidemiology, pathobiology, advances in developing diagnostics, vaccines, and control strategies. *Front Microbiol.* 9, 1941.
- Stewart AJ, Cuming RS. (2015) Update on the fungal respiratory disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 33, 43-62.
- Sweeney CR, Timoney JF, Newton JR, Hines MT. (2005) *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J Vet Intern Med.* 19, 123-134.
- Toombs-Ruane LJ, Riley CB, Kendall AT, Bolwell CF, Benschop J, Rosanowski SM. (2015) Antimicrobial Susceptibilities of Aerobic Isolates from Respiratory Samples of Young New Zealand Horses. *J Vet Intern Med.* 29, 1700-1706.
- Van Erck-Westergren E, Franklin SH, Bayly WM. (2013) Respiratory diseases and their effects on respiratory function and exercise capacity. *Equine Vet J.* 45, 376-387.
- Velineni, S., Desoutter, D., Perchec, A. M., & Timoney, J. F. (2014). Characterization of a mucoid clone of *Streptococcus zooepidemicus* from an epizootic of equine respiratory disease in New Caledonia. *Veterinary journal (London, England: 1997),* 200(1), 82-87.
- Vitale V, Sgorbini M, Cuteri V, Prezioso S, Attali AR, Bonelli F. (2019) Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria. *J Equine Vet Sci.* 79, 9-12.
- Wilson WD. (2001) Rational selection of antimicrobials for use in horses. *Ann Conven Am Assoc Eq Prac.* 47, 75-93.
- Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. (2005) Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol.* 43, 120-126.



Düvelerde vajinal akıntılarının bakteriyolojik değerlendirilmesi

Elçin Günaydın^{1*}, Gülşen Goncagül²

¹ Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu, Türkiye

² Bursa Uludağ Üniversitesi, Mennan Pasinli Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 10.02.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 17.03.2022

Özet: İneklerde reproduktif bozukluklar, üreme verimliliğinin azalmasının ana belirleyici faktördür. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de süt üretimindeki ekonomik kayıpların en önemli nedeni üreme sistemi enfeksiyonlarıdır. Enfeksiyon kaynaklı infertilitenin büyük bir bölümüne bakteriyel etkenler neden olur. Bu çalışma, 56 adet Holstein ırkı düvede 3 grup halinde yürütülmüştür. Grup I; bulanık ve irinli çara akıntısı olan 12 (%21.4) düve, Grup II; repeat breeder (döl tutmayan) 9 (%16,1) düve, Grup III; normal çara akıntısı görülen tohumlama yapılmamış 35 (% 62,5) düveden oluşmaktadır. Çalışma gruplarında düvelerin vajinasında kolonize olan bakterileri tespit etmek ve baskın bakteri gruplarında antibiyotik duyarlılığını belirlemek amaçlanmaktadır. Çalışma gruplarına dahil düvelerin vajinal akıntılardan 82 bakteri tespit edilmiştir. Yirmialtı (%31,7) *Escherichia coli* (*E. coli*), 10 (%12.2) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), 9 (% 11.1) *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), 7 (%8,5) *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), 5 (%6,1) *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) ve 10 (% 30,4) farklı bakteri izole edilmiştir. İneklerde infertiliteye neden olan, *E. coli*, *S. aureus*, *S. uberis*, *S. epidermidis* ve *S. maltophilia* etkenlerine karşı 8 antibiyotiğin duyarlılığı antibiyogramla incelenmiştir. Sonuç olarak, düvelerden izole edilen bakteriler gruplar arasında farklılık gösterse de en baskın etkenin *Escherichia coli* olduğu ve *Escherichia coli*'ye karşı gentamisin ve seftiofur'un %100 etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyogram, Bakteri, Düve, Reprodüktif bozukluk.

Bacteriological evaluation of vaginal discharges in heifers

Abstract: Reproductive disorders in cows are the main determinant of reduced reproductive efficiency. Reproductive system infections are the most important cause of economic losses in milk production in our country as in the world. Bacterial agents are responsible for most of the infection-induced infertility. This study was carried out in 3 groups of 56 Holstein heifers. The groups as follows; Group 1: 12 (21.4%) heifers with turbid and purulent cherries, Group II: repeat breeder (non-breeding) 9 (16.1%) heifers, Group III; 35 inseminated (62.5%) heifers with normal chervil discharge. It is aimed to detect the bacteria colonized the vagina of heifers in the study groups and to determine the antibiotic susceptibility in the dominant bacterial groups. Eighty-two bacteria were determined from the vaginal discharges of the heifers included in the study groups. Twenty-six (31.7%) *Escherichia coli*, 10 (12.2%) *Staphylococcus aureus*, 9 (11.1%) *Streptococcus uberis*, 7 (8.5%) *Staphylococcus epidermidis*, 5 (6.1%) *Stenotrophomonas maltophilia*, and 10 (30.4%) different bacteria were isolated. Susceptibility of 8 antibiotics against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Stenotrophomonas maltophilia* causing fertility in cows, were examined by antibiogram. As a result, although the bacteria isolated from heifers differed among the groups, it was determined that *Escherichia coli* was the most dominant bacteria and gentamicin and ceftiofur exhibited 100% antibacterial effect against *Escherichia coli*.

Keywords: Antibiogram, Bacteria, Heifer, Reproductive disorder.

Giriş

Üreme sistemi problemleri ve infertilite, süt ineği yetiştiriciliğinin ekonomik kayıp oluşturan problemlerinin başında gelmektedir (LeBlanc ve ark., 2002; Amiridis ve ark., 2003). Üreme sistemi mikrobiyal kompozisyonunun üreme sisteminin sağlığı ve infertiliteyle ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Penna ve ark., 2013). Sağlıklı ineklerin vajinal mukozasına kolonize olan yerel mikrobiyotaya; Gram pozitif koklar, basiller, Enterobacteriaceae dahil aerobik, fakültatif anaero-

bik ve zorunlu anaerobik mikroorganizmaların bir kombinasyonundan oluşan dengeli ve dinamik bir ekosistemdir.

Bu mikrobiyotayı oluşturan sistem; fizyolojik, immünolojik, beslenme, hormonal değişim ve tedavi gibi faktörlerle değişebilmektedir (Nader ve Otero, 2009). Bu değişimlere bağlı olarak, patojenik bakterilerin, üreme sistemi enfeksiyonlarının patojenezinde de rolü birçok çalışmada ortaya konmuştur

(Sheldon ve ark., 2002; Sheldon ve Dobson, 2004; Williams ve ark., 2005; Santos ve ark., 2010). Patojenik bakteriler, özellikle anovulasyona aracılık ederek, gelişmekte olan oositlerin döllemesini önlemekte veya normal gelişmeyi engelleyerek doğurganlığı olumsuz etkilemektedirler (Gilbert, 2019). Hatta görünüşte sağlıklı cinsel organı olan, üç veya daha fazla tohumlamada gebe kalamayan ancak normal kızgınlık döngüleri sergileyen (Repeat Breeder) bir düvede bile spesifik olmayan enfeksiyöz ajanlar tarafından oluşturulan enfeksiyon kaynaklı üreme sistemi sorunları oluşabilmektedir (Sharma ve ark., 1988; Singh ve ark., 1996; Arun ve Umesh, 2009; Bhat ve ark., 2014). Etiyolojik olarak multifaktöriyel etiyojisi olan repeat breeder olgularında patojenik veya non-patojenik bakteriler; özellikle uterus ıngılanmalarına buna bağılı olarak endometriumda histolojik değişikliklere, yumurta kanalının tıkanmasına neden olmaktadır. Böylece spermatozoonun taşınmasında olumsuzluklar oluşmakta veya spermin bakteriyel toksinlerle ölümüyle fertilizasyon etkilenmektedir (El-Khadrawy ve ark., 2011; Bhat ve ark., 2014). Yerel mikrobiyotanın çoğalmasından kaynaklanan bölgesel eritem, prulent vajinal akıntı ile üreme sisteminin homeostazının bozulması sonucu üreme performansının büyük ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Sheldon ve ark., 2006; Martins ve ark., 2009).

Vajinal mikrobiyal kompozisyon, hem hayvanlarda hem de kadınlarda üreme sistemi sağlığı ve doğurganlıkla ilişkilendirilip, geniş çapta çalışılmıştır (Vitali ve ark., 2012; Penna ark., 2013; Lorenzen ve ark., 2015). İnfertilitenin etiyojistik ajanları olarak bakterilerin önemi bilinmektedir. Normalde sağlıklı ineklerin vajinasında bakteri florası vardır ancak bakteri popülasyonu savunma mekanizması tarafından sınırlar içinde tutulur. Üreme sistemi içerisinde en yaygın izole edilen bakteriler koliform grubu özellikle *E. coli*, Gram pozitif koklar, esas olarak *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp.'dir (Sargison ve ark., 2007). Bu ajanlar vajina ve serviksten veya kan dolaşımıyla uterusu ulaşarak enfeksiyon kaynağı olabilirler (Sheldon ve Owens, 2018; Helfrich ve ark., 2020).

Bu çalışmanın amacı, üreme problemi olan ve sağlıklı düvelerin vajinal akıntılarında bakteriyel popülasyondaki değişiklikleri belirlemek ve izole edilen dominant bakteri gruplarında antibiyotik duyarlılığını belirlemektir.

Gereç Yöntem

Çalışma grupları

Bu çalışmada, Orta Karadeniz Bölgesi'nde 56 Holstein ırkı düve klinik gözlemler sonrasında gruplara ayrılarak incelenmiştir. Grup1; bulanık ve irinli çara akıntısı olan 12 düve (%21,4), Grup 2; repeat breeder 9 (%16,1) düve, Grup 3; normal çara akıntısı görülen tohumlama yapılmamış 35 (% 62,5) düve olmak üzere 3 çalışma grubu oluşturuldu.

Vajinal Örnekleme

Düvelerden örnekleme yapılmadan önce, kontaminasyonu engellemek için kuyruk yukarı kaldırılıp, dış genital bölgede vulva dudakları ve rima vulva benzalkonyum hidroklorür (Zefirolum®, Kimpa, İstanbul) ile temizlendi. Ardından steril bir havlu ile kurulandı. Sonra aralanan vulva dudakları arasından aynı kişi tarafından vajinanın arka kısmından steril sürüntü ile örnekler alındı. Alınan sürüntü örnekleri Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) bulunan tüpler içerisine alınarak soğuk koşullar altında laboratuvara ulaştırıldı.

Bakteriyolojik Muayene

Fluid Thioglycollate Medium (BBL; 221196) içerisinde bulunan sürüntü örnekleri 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra EMB agarda (Eosin-Methylenblue-Laktoz-Sakaroz, BBL; 221355) ve kanlı agarda (BBL; 297876) izolasyon çalışması gerçekleştirildi. Genel bakteriyolojik incelemeler için, agarlar aerobik koşullarda, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen koloniler, koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerine göre değerlendirildi. Bakteriyel izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen saf kültürlerin identifikasyonu, BBL kristal (Becton-Dickinson, Sparks, USA) Gram pozitif ve Gram negatif ID sistem kitleri ve bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal duyarlılık, Mueller Hinton Agar kullanılarak, disk difüzyon yöntemiyle test edildi. Antibiyogramda kullanılan antibiyotik diskleri; penicillin (P) (10U; Oxoid), eritromisin (E) (30µg; Oxoid), amoksisilin/klavulonikasıit (AMC) (30µg, Oxoid), gentamisin (CN) (10µg; Oxoid), tetrasiklin (TE) (30µg; Oxoid), seftiofur (EFT) (30µg; Oxoid), enrofloksasin (ENR) (5µg; Oxoid), sulfometoksazol/trimetoprim (SXT) (25 µg; Oxoid)'dir. Antibiyotik duyarlılık testi, her bir bakteri için, Mueller Hinton agar (Oxoid®; 0337) besiyeri yüzeyine 0,5 McFarland düzeyinde bakteri süs-

pansiyonu yayıldıktan sonra ilgili 8 antibiyotik diski 2 petri kabına paylaştırılarak disk diffüzyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu çalışmada test edilen suşlar, inhibisyon zon çapına göre dirençli (R) , orta duyarlı (I) ve duyarlı(S) olarak kaydedildi (CLSI, 2015).

Bulgular

Çalışma gruplarından Grup1-3'de toplanan örneklerden bakteri izolasyonu şu şekildedir: Bulanık ve irinli çara akıntısı olan 12 (Grup I) düvenin tamamında *E. coli* (%100), 6 düvede *S. uberis* (%50), 8 düvede *S. aureus* (%66,66), 2 düvede *S. maltophilia* (%16,66) izole edildi. Bu grupta yer alan 12 düve içerisinde mix kültür şeklinde *Acinetobacter iwoffii*, (*A. iwoffii*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) izole edildi.

Repeat breeder 9 (Grup II) düvenin, 8'sinde *E. coli* (%88,88), 5'inde *S. epidermidis* (%55,55), 4'ünde *S. maltophilia* (%44,44) izole edildi. Dokuz repeat breeder düveden üstte bulunan etkenlerle birlikte miks kültür olarak, 3'ünde *S. uberis*, *K. oxytoca*, *P. multocida* (%33,33), 2'sinde *S. aureus*, *A. iwoffii*, *Corynebacterium pseudomonastuberculosis* (*C. pseudomonastuberculosis*), *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*) (%22,22) izole edildi.

Normal çara akıntısı görülen tohumlama yapılmamış 35 (Grup III) düvenin ise; 6'sında *E. coli* (%17,14), 4'ünde *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*), 2'sinde *Morganella morganii* (*M. morganii*) ve *Sphingomonas paucimobilis* (*S. paucimobilis*) 1'inde ise *S. epidermidis* izole edildi.

Çalışmaya dahil edilen gruplardan alınan numunelerde, Grup I ve Grup II'nin %100'ünde, Grup III'te ise, 12 düvede %34,28 bakteriyolojik üreme saptandı. Tüm gruplarda izole edilen bakteriler Tablo 1'de listelendi.

Antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda, *S. aureus*'ta test edilen 8 antibiyotikten penisilin ve tetrasikline karşı göze çarpan bir direnç (%100) saptandı (Tablo 2). Çalışmamızda dominant izolat olarak saptanan *E. coli*'nin (%31,7) test edilen antibiyotiklere karşı duyarlılık profili; gentamisin ve seftiofur (%100), amoksisilin/klavulonikasıit (%96,2), eritromisin, enrofloksasin ve sulfometoksazol/trimetoprim (%92,31), tetrasiklin (% 88,46) olarak belirlendi. *S. uberis* izolatları penisiline, amoksisilin/klavulonikasıite, seftiofura ve sulfometoksazol/trimetoprim (%100) duyarlı bulundu. *S. epidermidis* izolatlarının sadece seftiofura dirençli, diğer 7 antibiyotikten 4'üne %100 duyarlı olduğu belirlendi. *S. maltophilia* izolatlarının ise test edilen 8 antibiyotikten hiçbirine duyarlı olmadığı saptandı (Tablo 2).

Tablo 1. Düvelerin vajinasında kolonize olan bakteriler.

Bakteriler	İzolasyon sayısı	İzolasyon oranı (%)
<i>Escherichia coli</i>	26	31,7
<i>Streptococcus uberis</i>	9	11,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	12,2
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	3	3,7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	4,9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	7,3
<i>Corynebacterium pseudomonastuberculosis</i>	2	2,4
<i>Bacillus megaterium</i>	4	4,9
<i>Morganella morganii</i>	2	2,4
<i>Pasteurella multocida</i>	4	4,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	8,5
<i>Corynebacterium bovis</i>	2	2,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,2
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	2,4
TOPLAM	82	100

Tablo 2. Antibiyogram sonuçları.

İzole Edilen Bakteri İsimleri ve Sayısı	ANTİBİYOTİK							
	P	E	AMC	CN	TE	EFT	ENR	SXT
<i>E.coli</i> (n=26)	+	24	25	26	23	26	24	24
	¥	4	2	1	3		2	2
	Θ	22						
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=10)	+	8		10		10	7	9
	¥	2	10				3	1
	Θ	10			10			
<i>Streptococcus uberis</i> (n=9)	+	9	9		2	9	8	9
	¥		2		1		1	
	Θ		7		8			
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=7)	+	7	6	7		7	4	6
	¥		1		7		2	1
	Θ						1	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=5)	+	4	3	1		4		3
	¥	1	2	3	2		5	1
	Θ			1	3	4	1	1

+: Duyarlı, ¥: Orta Duyarlı, Θ: Dirençli, P: Penisillin E: Eritromisin AMC: Amoksisilin/Klavulonikası, CN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, EFT: Seftiofur, ENR: Enrofloxasin, SXT: Sulfometoksazol/Trimetoprim

Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda, kültür temelli çalışmalarla sağlıklı ve metritisli ineklerin uterus mikrobiyotasının ayrıntılı olarak tanımlandığı çalışmalar mevcut olsa da vajinal akıntılarında inflamasyon derecesine göre farklılık olan ineklerin vajinal mikrobiyota konsorsiyumuyla ilgili çok az çalışmaya rastlanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, östrus ile senkronize edilmiş ineklerde bakteriyel vajinal toplulukların kompozisyonunu analiz etmek için kültürden bağımsız teknikleri kullanan mevcut hiçbir çalışma bulunmamaktadır (Santos ve ark., 2011; Machado ve ark., 2012; Wang ve ark., 2013; Wang ve ark., 2016). Günümüzde reproduktif hastalıkların mikrobiyal popülasyonla ilgili olduğu, kolonize olan mikrobiyotanın normal şartlarda zararsız olmasına karşın, travma veya eş zamanlı enfeksiyonlarla, mikrobiyotanın çoğalması hatta potansiyel patojenlere dönüşmesi söz konusudur (Martins ve ark., 2009). İneklerin üreme kanalında yaşayan aerobik, fakültatif-anaerobik ve anaerobik mikroorganizmaların, üreme fonksiyonuna etkileri hakkında bilgi yeterli değildir (Otero ve ark., 2000). Çalışma gruplarımızı içeren düvelerde bakteri izolasyonu ve izolasyon sıklığıyla ilgili ülkemizde yapılan

herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız ile 3 farklı grupta yer alan düvelerin vajinal mikrobiyotasının ana bileşenleri ortaya konulmuştur.

Reproduktif kanal bakteriyolojisi üzerine yapılmış diğer çalışmalara benzer şekilde bizim çalışma gruplarımızda da izole edilen dominat bakteri *E.coli* bulunmuştur (Otero ve ark., 2000; Williams ve ark., 2005; LeBlanc ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2017). *E.coli* sağlıklı düvelerde üreme sisteminin normal mikrobiyotası içinde tanımlansa da, birçok çalışmada endometritisin oluşumunda rol aldığı bildirilmiştir (Silva ve ark., 2009; Bicalho ve ark., 2010; Sheldon ve ark., 2010; Kasse' ve ark., 2016). Özellikle *E.coli*'nin *pap*, *sfa*, *hlyA*, *cnf1* ve *fim* gibi üropatojenik virülans faktörleri ile ürogenital sistemin epitel hücrelerine adheze olması, biofilm oluşumu, flagella aracılı hareketliliği, ekzotoksinleri gibi önemli virülans faktörlerinden dolayı üreme sistemi enfeksiyon kaynağı olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2003; Williams ve ark., 2005; Arora, 2007; Sheldon ve ark., 2010; Sheldon, 2015). Aynı zamanda *fimH* geni *E.coli*'nin ineklerde genital bölgeye adhezyonunu sağlayarak uterus enfeksiyonlarının daha şiddetli seyretmesine yol açmaktadır. *fimH* geninin, konakçı dokuların epitel hücrelerine adhezyon, istila ve biyofilm oluşumu

ile ilişkili bir Tip 1 pili olduğu vurgulanmıştır (Bien ve ark., 2012; de Cássia ve ark., 2019). Çalışmamızda da vajinal flora içerisinde belirlediğimiz *E.coli*'nin, düvelerde doğum sonrası uterus enfeksiyonuna kaynak oluşturabileceği sonucuna varılmıştır (Wang ve ark., 2013). Gilbert ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, ürogenital sistemde *E.coli* varlığının, süt ineklerinde gebe kalamama, tohumlama sayısının artması ve metritis gibi üreme yetersizliği arasında bir bağlantı olduğunu vurgulamışlardır.

Bazı araştırmacıların çalışmalarında ortaya koyduğu gibi *S. aureus*'un da üreme sistemi enfeksiyonlarında baskın patojenler arasında yer aldığı bildirilmektedir (Földi ve ark., 2006; Williams ve ark., 2007; Galvão, 2018). Çalışmamızda da *S.aureus*'un (%12,2) tüm gruplarda *E.coli*'den sonra ikinci baskın izolat olduğu belirlendi. *S. aureus*, kan dolaşımı enfeksiyonları, pnömoni ve cerrahi alan enfeksiyonları dahil olmak üzere sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonların başlıca ajanıdır. Mukoza epitel yüzeylerine kolonize olması nedeniyle konağın endojen florasının patojen kaynağı olarak da bildirilmektedir (Ringberg ve ark., 2006; Beigi ve Hanrahan, 2007; Anderson ve ark., 2013). İneklerin vaginal mikrobiyotası üzerine yapılan benzer çalışmalarda da *Staphylococcus* spp'nin yaygın olduğu rapor edilmiştir (Rocha ve ark., 2004; Gani ve ark., 2008). Gani ve ark. (2008) yaptıkları araştırmada, özellikle ineklerin vajinal mikrobiyotasıyla ilişkili olarak uterus enfeksiyonlarında da *Staphylococcus* spp. ve *E. coli*'yi predominant etkenler olarak bulmuş ve bu etkenlerin uterus enfeksiyonuyla ilişkilerinin olduğunu vurgulamışlardır.

Vulva ve vajina mukozasındaki baskın enterobakteriler gastrointestinal sistem kökenlidir ve dokular içine enflamatuvar hücrelerin hareketine ve enfeksiyöz süreçlere neden olan invazif özelliklere sahiptirler. Bunlar dışında, vulva ve vajina mukozasında *S. aureus*'un yaygın mevcudiyeti muhtemelen deri ve mukoz membran mikroflorasının bir üyesi olması kaynaklıdır (Silva ve ark., 2011).

Husted (2005), siğir vajinitisine neden olan bakterilerin yanı sıra klinik olarak sağlıklı siğir vajinasından izole edilen bakterilerin belirlenmesi üzerine yaptığı çalışmada, vajinitis bulgusu saptananlarda %4, vajinitis olmayanlarda ise %2 oranında *S. uberis* izole ettiğini bildirmiştir. Araştırmamızda aynı etken, sırasıyla Grup I ve Grup II'de sırasıyla %50 ve %33 oranlarında tespit edilirken, Grup III'de ise hiç izole edilmemiştir. Genital sistem problemlili siğir vakaları üzerine yapılmış çalışmada, *S. uberis*'in siğir genital yolunda özellikle vajina ve serviksin daha derin kısmına kolonize olduğunu bildirmişlerdir (Khan, 2002). Etken, sıklıkla ve fazla sayıda *S. uberis* mas-

titisin meydana geldiği dönem olan doğumdan hemen önce ve doğumdan hemen sonra izole edilmiştir (Reinoso ve ark., 2011; Pérez -Ibarreche ve ark., 2021).

Manickam ve ark. (2019) sağlıklı görünen koyunların vajina svaplarından ikinci dominant bakteri olarak *S. epidermidis* (%52,63) izole etmişlerdir. Yine Al-Zubaidi (2015) yaptığı çalışmada, ineklerin genital sisteminin farklı bölgelerinde bakteri dağılımını incelediğinde vajinadan izole edilen 19 bakterinin, %15,79'unun *S. epidermidis* olduğunu rapor etmiştir. Çalışmamızda gruplar arasında *S. epidermidis* en fazla repeat breeder (Grup II)'dan izole edilmiştir. Mastitiste izole edilen en yaygın koagülaz negatif stafilokok türlerinden olan *S. epidermidis* fırsatçı mikroflora içerisinde yer almaktadır (Taponen ve ark., 2006).

Son 20 yılda, ciddi fırsatçı enfeksiyonlara neden olan bir bakteri de *S. maltophilia* olarak öne çıkmıştır (Enoch ve ark., 2007; Looney ve ark., 2009). Hayvan kaynaklı *S. maltophilia* hakkındaki literatürler insan kaynaklı olanlara göre çok daha azdır. Çünkü hayvanlarda nadiren önemli bir patojen olarak bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2003). Çalışmamızda Grup I ve Grup II de sırasıyla, %16,66 ve % 44,44 oranında izole edilmiştir. *S. maltophilia* izolasyonu, bakterinin izolasyon başarısını arttıran seçici besiyeri olmadığı için, rutin veteriner tanı laboratuvarlarında muhtemelen teşhisinin yapılmasında yetersiz kaldığı ön görülmektedir (Kerr ve ark., 1996). Bottone ve ark. (1994), *S. maltophilia*'nın virulens özellikleri olan DNase, RNase, fibrinolisin, lipazlar, hyaluronidaz, proteaz ve elastaz gibi bazı ekstraselüler enzimlerin enfeksiyon oluşumunda etkin olduğunu savunmuşlardır. Bir diğer patojenite faktörü, sentetik materyale yapışabilme yeteneğidir. Bu yeteneği ile biyofilm oluşturur. Böylece konak immün defansına ve farklı antimikrobiyal ajanlara karşı doğal olarak korunmaktadır (Bottone ve ark., 1986; Jucker ve ark., 1996; Dignani ve ark., 2003; De Oliveira-Garcia ve ark., 2003; Di Bonaventura ve ark., 2004).

Çalışmamızda sekiz farklı antimikrobiyal ajana karşı disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık ve direnç kalıpları incelenmiştir. Seftiofur duyarlılığı; *E.coli*, *S. aureus*, *S. uberis*, *S. epidermidis*'te %100, *S. maltophilia*'da ise %80 oranında saptanmıştır. Drillich ve ark. (2001)'nin yaptıkları çalışmada, *E. coli*'de seftiofur duyarlılığını çalışmamıza benzer olarak %100 bulurken, aynı izolatin tetrasikline duyarlılığını ise %50 olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise tetrasiklin duyarlılığı *E. coli*'de %88,46 gibi oldukça yüksek oranda bulunmuştur. Ukrayna'da Elias ve ark. (2020)'nin yaptıkları çalışmada seftiofur

duyarlılığı *E.coli* ve *S. aureus* izolatlarında sırasıyla, %22 ve %17 bulunmuştur. Geniş spektrumlu sefalosporinlerin bölgesel olarak sınırsız kullanımı ile bu durum açıklanmıştır (Ali ve ark., 2017; Iakovlieva ve Bahlai, 2019).

Yapılan çalışmalarda tetrasiklinin *E.coli* ve *S. aureus* üzerinde duyarlılığının çalışmamıza benzer olarak %50 üzerinde olduğunu rapor edilmiştir (Drillich ve ark., 2001; Berhilevych ve ark., 2017; Elias ve ark., 2020). *E. coli* izolatlarında tetrasiklin ve analoglarına karşı yaygın direnç mekanizması, akış pompası işleminden sorumlu proteinin sentezini kodlayan *tetA* geni sebeplidir (Ozgumus ve ark., 2007; Raheel ve ark., 2020).

Moges ve ark. (2013)'nin yaptığı çalışmada, *S. aureus* ve *E.coli*'nin gentamisin duyarlılığı değerlendirildiğinde, çalışmamızla aynı oranda (%100) *S. aureus*'un gentamisine duyarlılık gösterdiği, *E. coli*'nin ise %60 oranında gentamisin duyarlılığı sergilemesiyle bizim çalışmamızdaki orandan (%100) düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda yer alan tüm gruplarda olduğu gibi, ürogenital sistem bakteriyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda da, bakteri izolatları ve oranları değişmekle birlikte enterik orijinli *E.coli*'nin dominant izolat olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, etkili antimikrobiyal ajanlar, bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç nedeniyle farklılıklar göstermektedir. Araştırmamızda tüm gruplarda vajinal akıntıdan alınan örneklerde tespit edilen izolatların genital sistem enfeksiyonuna yol açabilecek izolatlar olmaları nedeniyle bu izolatlara doğru antimikrobiyal ajanların seçimi ile uterus enfeksiyonlarının daha etkin bir şekilde engellenerek, ekonomik kayıpların önüne geçilebileceği düşüncesindeyiz.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler:15.02.2014 Tarih ve 28914 Sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" 'in 8. maddesinin k fıkrası gereği ;dışkı veya altlık toplama örneği, sürüntü ile örnek alma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun(HAY-DEK) iznine tabi değildir.

Kaynaklar

- Al-Zubaidi SF. (2015) Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from the genital system of cows in Al-Hilla, Iraq. *Malays J Vet Res*.6 (1), 53-59.
- Ali T, Rahman SU, Zhang L, Shahid M, Han D, Gao J, Zhang S, Ruegg PL, Saddique U, Han B. (2017) Characteristics and genetic diversity of multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *Oncotarget*. 8, 90144-90163.
- Amiridis GS, Fthenakis GC, Dafopoulos J, Papanikolaou T, Mavrogianni VS. (2003) Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis. *J Vet Pharmacol Ther*. 26(5), 387-390.
- Anderson MJ, Scholz MT, Parks PJ, Peterson ML. (2013) Ex vivo porcine vaginal mucosal model of infection for determining effectiveness and toxicity of antiseptics. *J Appl Microbiol*. 115(3), 679-688.
- Arora N. (2007) Role of uropathogenic virulence factors in the pathogenesis of *E. coli*-induced cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. PhD thesis, University of Melbourne, Australia.
- Arun K, Umesh S. (2009) Fertility status of Haryana cows. *Indian Vet J*. 86(8), 807-809.
- Beigi R, Hanrahan J. (2007) *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization rates among gravidas admitted to labor and delivery: a pilot study. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2007, 70876.
- Berhilevych OM, Kasiachuk VV, Kukhtyn MD, Lotskin IM, Garkavenko TO, Shubin PA. (2017) Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine. *Regul Mech Biosyst*. 8(4), 559-563.
- Bhat FA, Bhattacharyya HK, Syed Akram Hussain SA. (2014) White side test: a simple and rapid test for evaluation of nonspecific bacterial genital infections of repeat breeding cattle. *Vet Res Forum*. 5, 177-180.
- Bicalho RC, Machado VS, Bicalho MLS, Gilbert RO, Teixeira AGV, Caixeta LS, Pereira RV V. (2010) Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J Dairy Sci*. 93(12), 5818-5830.
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. (2012) Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol*. 2012, 681473.
- Bottone EJ, Pere AA, Gordon RE, Qureshi MN. (1994) Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *J Med Microbiol*. 40(2), 148-154.
- Bottone EJ, Reitano M, Janda JM, Troy K, Cuttner J. (1986) *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum. *J Clin Microbiol*. 24(6), 995-997.
- Chen YM, Wright PJ, Lee CS, Browning GF. (2003) Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Vet Microbiol*. 94(1), 57-69.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. M100-S25. CLSI, 35.
- de Cássia BL, Oba E, Bicudo SD, da Silva LD, Siqueira AK, de Souza MMM, Nogueira M, de Figueiredo PJC, Listoni FJP, Ribeiro MG. (2019) Virulence factors and phylogenetic group profile of uterine *Escherichia coli* in early postpartum of high-producing dairy cows. *Anim Prod Sci*. 59, 1898-1905.
- De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcántara N, Martinez MB, Girón JA. (2003) Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol*. 5(9), 625-636.
- Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. (2004) Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(1), 151-160.

- Dignani MC, Graziutti M, Anaissie E. (2003) *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 24(01), 89-98.
- Drillich M, Beetz O, Pfützner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzer P, Nattermann H, Heuwieser W. (2001) Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 84(9), 2010-2017.
- Elias L, Balasubramanyam AS, Ayshpur OY, Mushtuk IU, Sheremet NO, Gumeniuk VV, Musser J, Rogovskyy AS. (2020) Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* Isolated from Mastitic Dairy Cattle in Ukraine. *Antibiotics.* 9(8), 469.
- El-Khadrawy HH, Ahmed WM, Hanafi M. (2011) Observations on repeat breeding in farm animals with emphasis on its control. *J Reprod Infertil.* 2(1), 1-7.
- Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. (2007) Non-fermentative Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 29, 33-41.
- Földi J, Kulcsar M, Pecsai A, Huyghe B, De Sa C, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. (2006) Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci.* 96(3-4), 265-281.
- Galvão KN. (2018) Postpartum uterine diseases in dairy cows. *Anim Reprod.* 9(3), 290-296.
- Gani MO, Amin MM, Alam MG, Kayesh ME, Karim MR, Samad MA, Islam MR. (2008) Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangladesh J Vet Med.* 6(1), 79-86.
- Gilbert RO. (2019) Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract. *J Dairy Sci.* 102(4), 3754-3765.
- Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. (2005) Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* 64(9), 1879-1888.
- Helfrich AL, Reichenbach HD, Meyerholz MM, Schoon HA, Arnold GJ, Fröhlich T, Weber F, Zerbe H. (2020) Novel sampling procedure to characterize bovine subclinical endometritis by uterine secretions and tissue. *Theriogenology.* 141, 186-196.
- Husted JR. (2005) Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis. Doctoral dissertation, Texas A and M University, USA.
- Iakovlieva L, Bahlai T. (2019) B-lactam antibiotics in Ukraine: market and consumption analysis in 2013-2018. *SR Pharm Sci.* (2), 16-21.
- Johnson EH, Al-Busaidy R, Hameed MS. (2003) An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats. *J Vet Med Series B.* 50(2), 102-104.
- Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ. (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol.* 178(18), 5472-5479.
- Kassé FN, Fairbrother JM, Dubuc J. (2016) Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and postpartum metritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 99(6), 4656-4667.
- Kerr KG, Denton M, Todd N, Corps CM, Kumari P, Hawkey PM. (1996) A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 15(7), 607-610.
- Khan IU. (2002) Identification and Further Characterization of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* Isolated from Bovine Milk Samples. Faculty of Veterinary Medicine Justus-Liebig-University, Giessen, Germany.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. (2002) Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 85(9), 2223-2236.
- LeBlanc SJ, Osawa T, Dubuc J. (2011) Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 76(9), 1610-1618.
- Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis.* 9(5), 312-323.
- Lorenzen E, Kudirkiene E, Gutman N, Grossi AB, Agerholm JS, Erneholt K, Skytte C, Dalgaard MD, Bojesen AM. (2015) The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle. *Vet Res.* 46(1), 1-13.
- Machado VS, Oikonomou G, Bicalho ML, Knauer WA, Gilbert R, Bicalho RC. (2012) Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol.* 159(3-4), 460-469.
- Manickam R, T Reetha L, Puvarajan B. (2019) Isolation and identification of bacterial species from vagina of apparently healthy ewes. *Int J Sci Environ Technol.* 8(5), 1017-1022.
- Martins G, Figueira L, Penna B, Brandão F, Varges R, Vasconcelos C, Lilenbaum W. (2009) Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progesterin-impregnated intravaginal sponges. *Small Rumin Res.* 81(2-3), 182-184.
- Moges N, Regassa F, Yilma T, Unakal CG. (2013) Isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria from dairy cows with clinical endometritis. *J Reprod Infertil.* 4(1), 4-8.
- Nader-Macias ME, Otero MC. (2009) Lactic Acid Bacteria as probiotic on the prevention of reproductive diseases. In: *Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed* ed. Guerra, N.P. and Castro, Kerala, India: Research Signpost. L.P. pp. 119-174.
- Otero C, Saavedra L, Silva de Ruiz C, Wilde O, Holgado AR, Nader-Macias ME. (2000) Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Lett Appl Microbiol.* 31(3), 251-254.
- Ozgunmus OB, Celik-Sevim E, Alpaya-Karaoglu S, Sandalli C, Sevim A. (2007) Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *J Microbiol.* 45(5), 379-387.
- Penna B, Libonati H, Director A, Sarzedas AC, Martins G, Brandão FZ, Fonseca J, Lilenbaum W. (2013) Progesterin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. *Anim Reprod Sci.* 142(1-2), 71-74.
- Pérez-Ibarreche M, Field D, Ross RP, Hill C. (2021) A Bioengineered Nisin Derivative to Control Biofilms of *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol.* ,87(16), e0039121.
- Reinosa EB, Lasagno MC, Dierker SA, Odierno LM. (2011) Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol Lett.* 318(2), 183-188.
- Ringberg H, Cathrine Petersson A, Walder M, Hugo Johansson PJ. (2006) The throat: an important site for MRSA colonization. *Scand J Infect Dis.* 38(10), 888-893.
- Rocha AA, Gambarini ML, Andrade MA, Oliveira Filho BD, Gomes FA. (2004) Cervico-vaginal microbiota around the parturition time. *Cienc Anim Bras.* 5(4), 215-220.
- Raheel IAER, Hassan WH, Salem SSR, Salam HSH. (2020) Biofilm forming potentiality of *Escherichia coli* isolated from bovine

- endometritis and their antibiotic resistance profiles. *J Adv Vet Anim.* 7(3), 442.
- Santos TMA, Gilbert RO, Bicalho RC. (2011) Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 94(1), 291-302.
- Santos TMA, Gilbert RO, Caixeta L S, Machado VS, Teixeira LM, Bicalho RC. (2010) Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *J Dairy Sci.* 93(1), 105-114.
- Sargison ND, Howie F, Mearns R, Penny CD, Foster G. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. *Vet Rec.* 160(25), 875.
- Sharma RN, Singh B K, Sharma MP. (1988) Bacteriological studies on the cervical mucus of repeat breeding crossbred cattle, their treatment and conception rate. *Indian J Anim Reprod.* 9(2), 105-109.
- Sharma A, Singh M, Kumar P, Sharma A, Kashyap A, Neelam IB, Sharma A, Chaudhary N, Sharma P. (2017) Bacterial isolation, culture sensitivity test, endometrial cytology of postpartum cows and assessment of their reproductive performance. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 6(9), 519-527.
- Sheldon IM. (2015) Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. *Reprod Fertil Dev.* 27(1), 72-81.
- Sheldon IM, Dobson H. (2004) Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci.* 82, 295-306.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* 65(8), 1516-1530.
- Sheldon IM, Owens SE. (2018) Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Anim. Reprod.* 14(3), 622-629.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. (2002) Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction.* 123(6), 837-845.
- Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. (2010) Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS one.* 5(2), e9192.
- Silva VF, Damasceno TE, Souza NJ, Franco I, Costa MM. (2011) Cervical-vaginal microbiota of crossbred sheep in Petrolina/PE, Brazil, and its susceptibility to antibiotics. *Pesqui Vet Bras.* 31(7), 586-590.
- Silva E, Leitão S, Tenreiro T, Pomba C, Nunes T, da Costa L L, Mateus L. (2009) Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *J Dairy Sci.* 92(12), 6000-6010.
- Singh NP, Chaturvedi VK, Singh DP. (1996) Bacteriological studies on repeat breeder bovines. *Indian Vet J.* 73(4), 462-463.
- Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. (2006) Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol.* 115(1-3), 199-207.
- Vitali B, Cruciani F, Baldassarre ME, Capursi T, Spisni E, Valerii MC, Candela M, Turroni S, Brigidi P. (2012) Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiol.* 12(1), 1-14.
- Wang Y, Ametaj BN, Ambrose DJ, Gänzle MG. (2013) Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiol.* 13(1), 1-11.
- Wang J, Sun C, Liu C, Yang Y, Lu W. (2016) Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR. *Anaerobe.* 38, 1-6.
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. (2007) The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology.* 68(4), 549-559.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. (2005) Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology.* 63(1), 102-117.



İn vitro lipopolisakkarit uyarımlı karaciğer yangı modelinde Alfa-Terpineol'ün etkinliğinin araştırılması

Ayşe Pinar Tunçer¹ , Altuğ Küçükgül^{2*} , Mehmet Mustafa İşgör³

^{1,2,3} Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Hatay, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 12.01.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 21.03.2022

Özet: Terpinoller monoterpen bileşikler olup, birçok çalışmada antioksidan özelliklerinden dolayı antikanser, antikonvulsant ve antiülser gibi biyolojik etkileri ortaya konulmuştur. Araştırmanın amacını, LPS'in karaciğer hücrelerine uygulanarak oluşturulan yangı modelinde, α -terpineol'ün antiinflamatuvar ve antiapoptotik biyofonksiyonlarının araştırılması oluşturmıştır. Denemede insan orijinli HepG2 (ATCC® HB-8065) hücreleri materyal olarak seçilmiştir. LPS ve α -terpineol, hücrelere farklı konsantrasyonlarda 24 saat uygulanmıştır ve etkin konsantrasyonları, hücre canlılık testleriyle (MTT) gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, TNF- α , IL-1 β , IL-10, Kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri tam zamanlı kantatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) araştırılmıştır. LPS'in 50 ng/ml konsantrasyonu %11,5 oranında hücre kayıplarına neden olduğu belirlenmiş ve modelleme için bu konsantrasyon seçilmiştir. Ancak, 10 μ M konsantrasyonda α -terpineolün hücre kayıplarını % 2.12 oranında önlediği bulunmuştur. Çalışmada, LPS'in TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyonlarını arttırdığı, α -terpineol uygulamasının ise bu durumu tersine çevirdiği tespit edilmiştir. Yine, IL-10 gen ekspresyonu yüksek LPS konsantrasyonu ile baskılanırken, α -terpineol tarafından anlamlı düzeyde uyarıldığı da ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, LPS'in kaspaz 3 ve Bax gen ekspresyonlarını arttırdığı, ancak α -terpineol'ün bu stimülasyonu baskıladığı tespit edilmiştir. Bcl-2 gen ekspresyonları ise LPS tarafından baskılanırken, α -terpineol tarafından uyarıldığı bulunmuştur. Özetle, α -terpineol'ün kısa süreli ve düşük olan proliferatif konsantrasyonunun özellikle patojen kaynaklı karaciğer rahatsızlıklarında alternatif bir tedavi ajanı olabileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: α -terpineol, apoptoz, inflamasyon, lipopolisakkarit

Investigation of the efficiency of Alpha-Terpineol in the in vitro lipopolisaccharide stimulated liver inflammation model

Abstract: Terpeneols are monoterpene compounds, and biological effects like anticancer, anticonvulsant and antiulcer have been demonstrated in many studies due to their antioxidant properties. The aim of the research was to investigate the anti-inflammatory and antiapoptotic biofunctions of α -terpineol in LPS induced inflammation model of liver cells. HepG2 (ATCC® HB-8065) cells of human origin were selected as material. LPS and α -terpineol were applied to cells at different concentrations for 24 hours, and their effective concentrations were determined by cell viability tests (MTT). Afterwards, gene expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-10, Caspase 3, Bax and Bcl-2 were investigated by qRT-PCR method. LPS at 50 ng/ml, caused 11.5% cell loss and was chosen for modeling. However, α -terpineol at 10 μ M concentration prevented 2.12% of cell loss. In the study, LPS increased TNF- α and IL-1 β gene expressions, and α -terpineol application reversed this situation. Again, while IL-10 was suppressed by high LPS concentration, it was significantly stimulated by α -terpineol. Besides, LPS increased caspase 3 and Bax gene expressions, but α -terpineol suppressed this stimulation. Bcl-2 gene expressions were suppressed by LPS and stimulated by α -terpineol. In summary, short-term and low proliferative concentration of α -terpineol can be an alternative treatment agent, especially in pathogen-induced liver disorders.

Keywords: α -terpineol, apoptosis, inflammation, lipopolysaccharide

Giriş

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı en yaygın görülen karaciğer hastalığıdır ve dünya nüfusunun yaklaşık % 25'inde görülmektedir (Younossi ve ark. 2016). Hastalığın gelişiminde obezite ve hareketsiz bir yaşam tarzı, besin alımının bileşimi (örn. Mısır şurubundaki fruktoz), diyabet, insülin direnci, disbiyoz ve genetik yatkınlıklar gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Machado ve

ark. 2016). Hepatositlerde lipid ara maddelerinin birikimi, hepatosellüler lipotoksisteye neden olarak hücrel stres, işlev bozukluğu ve sonuç olarak da hücre ölümüne sebep olmaktadır (Hirsova ve ark. 2015). Lipopolisakkarit gram negatif bakterilerin hücre dışı membranında bulunan ve endotoksin olarak adlandırılan bir moleküldür (Wolff 1904). LPS, bağlayıcı proteinine bağlanarak myeloid farklılaşma faktörünü ve CD 14 uyarımlarını gerçekleştirerek,

TLR4 yolağını aktiveştirir. Bu yolun uyarımı TNF- α (Tümör nekroz faktör alfa), IL-6 (interlökin 6), IL-12 (interlökin 12), ve IL-1 β (interlökin 1 beta), gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımına neden olarak etkilenen dokuda yangıyı uyarır (Yang ve ark. 2000).

Terpineoller doğal olarak bulunabilen doymamış monosiklik mono-terpenoid alkollerdir. Bu bileşikler nergis ve frezya gibi çiçeklerde, mercanköşk, kekik, biberiye ve limon gibi bitkilerde yaygın olarak bulunurlar (Bauer ve ark. 2001; Sell 2003). Terpeneoller, özellikle α -Terpineol ve Terpinen-4-ol olarak en sık kullanılan bileşikler olup, insanlar, hayvanlar ve ayrıca bitkiler üzerinde çok çeşitli farklı biyolojik etkiler göstermektedirler. Sadece parfüm, kozmetik ve ev temizlik ürünlerinde değil aynı zamanda yiyecek ve içeceklerin tatlandırılmasında da kullanılan popüler koku bileşenleridir. Aynı zamanda çeşitli önemli biyolojik ve tıbbi özelliklere de sahiptirler (Sales ve ark. 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında, bu bileşiğin anti-hipertansif (Sabino ve ark. 2013), antiproliferatif (Lampronti ve ark. 2006), antienflamatuar (Held ve ark. 2007), antioksidan (Brand ve ark. 2001), antiülser (Khaleel ve ark. 2018) ve antikarsinogenik (Hassan ve ark. 2010) gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür.

Verilen bu bilgilerin ışığında, araştırmada E.coli'den izole edilen LPS'in karaciğer hücrelerine etkin konsantrasyonda uygulanarak oluşturulan yangı modelinde alfa terpineolün antiinflamatuar ve antiapoptotik gibi biyofonksiyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

Araştırmada materyal olarak sürekli hücre hattı HepG2 (ATCC® HB-8065™) hücreleri kullanıldı. Hücreler daha sonra içeriğinde % 10 oranında ısı maruziyetli fetal siğir serumu (FBS) ve penisilin/ streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunan, düşük glikoz konsantrasyonlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) kültür vasatında üretildi. Çalışma grupları her bir kuyucuğa ml'de 1×10^6 hücre gelecek şekilde oluşturuldu. Deneme Kontrol (K), LPS uygulanan grup (L), α -Terpineol uygulanan grup (T), LPS ile birlikte α -Terpineol uygulanan grup (T+L) olmak üzere 4 gruptan oluşturuldu.

Uygulamada kullanılan etken maddeler ve viyabilite testleri

Araştırmada *Escherichia coli* O111:B4 suşundan elde edilen lipopolisakkarit (LPS- Sigma, EU) ve α -terpineol (Sigma, EU) ticari olarak temin edildi ve hü-

re besiyerlerinde çözdürülerek çalışmada kullanıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda LPS (1, 10 ve 50 ng/ml) ve α -terpineol (10, 25 ve 50 μ M) 24 saat süreyle uygulanarak, bu maddelerin etkin konsantrasyonları Küçükgül ve Erdoğan (2014); rapor ettiği metod takip edilerek, MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) viyabilite testleriyle tespit edildi.

RNA izolasyonu ve qRT-PCR

İnkübasyon sonu hücrelerden mRNA eldesi RNA izolasyon reaktifi ile üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi (Trizol, Sigma, EU). RNA miktarı ve saflığı (OD260/OD280 nm oranı) spektrofotometrede (UV mini 1240, Shimadzu, JP) belirlendi. PCR reaksiyonu için cDNA sentezi ve PCR basamaklarını birlikte gerçekleştirebilecek "tek basamak özellikli ve "syber green" problu ticari kit temin edildi. (Verso-one step Sybr green master mix, Thermo, EU). Araştırılan genlere spesifik bir çift primerler (**β -actin, Forward** 5'-CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G-3',reverse, 5'-CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C-3'; **Kaspaz 3 Forward** 5'-TTT GGGG AGT AGA TTG CAG GG-3', reverse, 5'-TGC ACA TCC ACG ATT TGA TT-3' ; **IL-1 β Forward** 5'-GGT CAT TCT CCT GGA AGG AGG TCT GTG GGC -3',reverse, 5'-GCA AGG GCT TCA GGC AGG CCG CG-3'; **TNF- α Forward** 5'-CAG AGG GAA GAG 5'-TTC CCC AG-3', reverse 5'-CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG-3'; **Bax Forward** 5'-GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG-3', reverse 5'-CAT CTT CTT CCA GAT GGT GA-3'; **Bcl-2 Forward** 5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC-3', reverse 5'-GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA-3'; **IL-10 Forward** 5'-AAG TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT A-3', reverse 5'-ATG CCC CAA GCT GAG ACC CAA GAC CCA-3')ilave edilerek thermal saykılarda (Bio RAD CFX96) cDNA (tamamlayıcı DNA) dönüşümünü takiben ve PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle DDCT = (Cthedef gen – Ctbeta actin) denek grubu – (Cthedef gen – Ctbeta actin) kontrol grubu formülü kullanılarak, her bir gen için 2-DDCT formülünde yerine konularak mRNA transkripsiyon düzeyi misli olarak baskılanma ya da uyarılma şeklinde belirlendi.

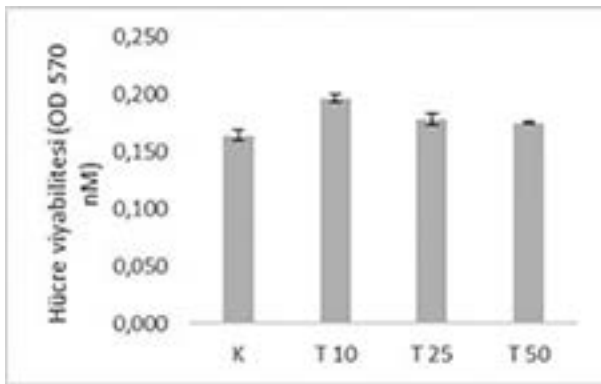
İstatistiksel Metot

Çalışma hücre canlılık verilerinin istatistiği, SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programının "One-way ANOVA" analiz yöntemiyle ortaya konuldu. İstatistiksel farklar ise "Duncan" testiyle tespit edildi. $p < 0.05$ ve bunun altındaki sonuçlar önemli olarak değerlendirildi. Araştırmada bulgular ortalama $\pm$ standart hata (S.E) şeklinde verildi.

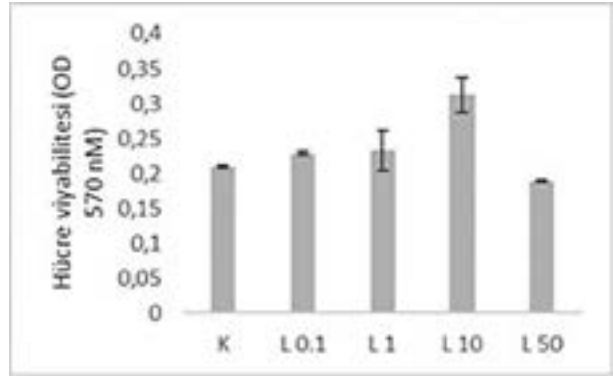
Bulgular

Hücre canlılığı test sonuçları

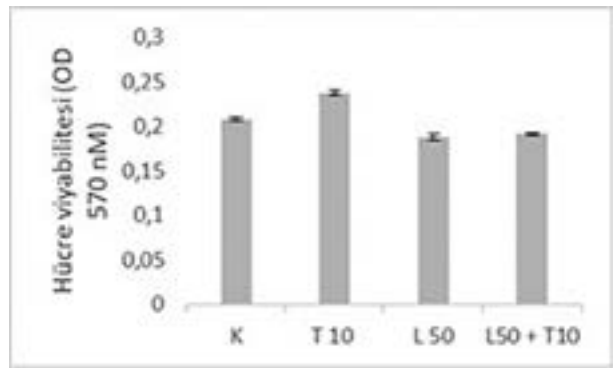
HepG2 hepatomalara farklı konsantrasyonlarda LPS ve α -terpineol 24 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuklardaki hücrelerin viyabilite kontrolleri MTT yöntemiyle gerçekleştirildi. Kontrol grubu ($0,164 \pm 0,009$) ile karşılaştırıldığında α -terpineol'ün 10, 25 ve 50 μ m konsantrasyonlarında, hücre sayısını % 20 ($0,196 \pm 0,007$), % 8 ($0,178 \pm 0,01$) ve % 6.6 ($0,175 \pm 0,02$) oranlarında arttırdığı tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 1). Hücre canlılık testlerine göre karaciğer hücrelerine uygulanan LPS, kontrol grubuna ($0,209 \pm 0,04$) göre düşük konsantrasyonlarda (0,1, 1 ve 10 ng/ml) hücre sayısını sırasıyla % 9 ($0,228 \pm 0,05$), % 11 ($0,233 \pm 0,64$) ve % 49 ($0,312 \pm 0,64$) oranlarında arttırdığı tespit edildi. Ancak LPS'in yüksek konsantrasyonunun (50 ng/ml) hücrelerde toksik etki yaparak % 11.5 ($0,188 \pm 0,04$) oranında kayıplara neden olduğu ortaya konuldu ($p < 0,05$). Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak etkin konsantrasyonun 50 ng/ml olarak seçildi ve çalışmanın devamında bu konsantrasyon referans olarak kullanıldı (Şekil 2). Etkin konsantrasyonda LPS ve α -terpineol'ün hücreler üzerine etkilerine bakıldığında kontrol grubuna göre ($0,209 \pm 0,05$) LPS 50 ng/ml konsantrasyonda uygulanan grupta ($0,188 \pm 0,07$) hücre canlılığının %10 düzeyinde kayıplara neden olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Bununla birlikte, LPS ile birlikte α -terpineol (10 μ m) uygulanan grup ($0,192 \pm 0,04$) ile LPS grubu karşılaştırıldığında hücre kayıplarında %2.12 düzeyinde geri çevirme olduğu ortaya konulmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 3).



Şekil 1. Alfa-terpineol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri



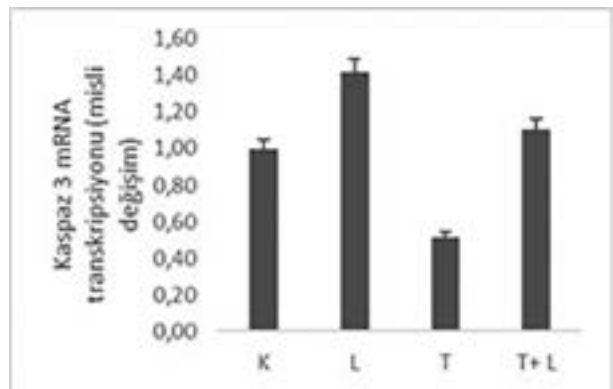
Şekil 2. LPS uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri



Şekil 3. Etkin konsantrasyonlardaki LPS ve α -terpineol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri

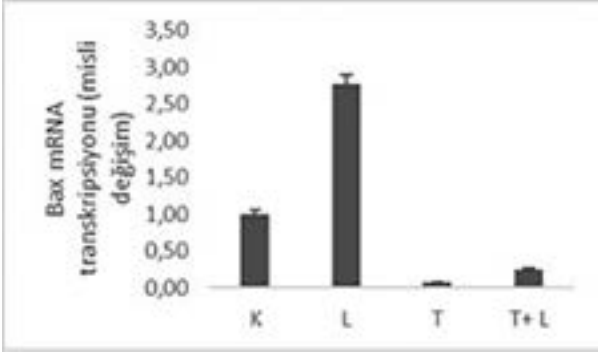
Gen ekspresyon analiz sonuçları

Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineol'ün kontrol grubuna göre kaspaz 3 ekspresyonunu yaklaşık 2 kat baskıladığı tespit edilirken, LPS'in kaspaz 3 düzeyini kontrol grubuna göre 1,42 kat uyardığı bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında, bu artışın 1,28 kat misli değişimlerle baskılandığı ortaya konuldu (Şekil 4).



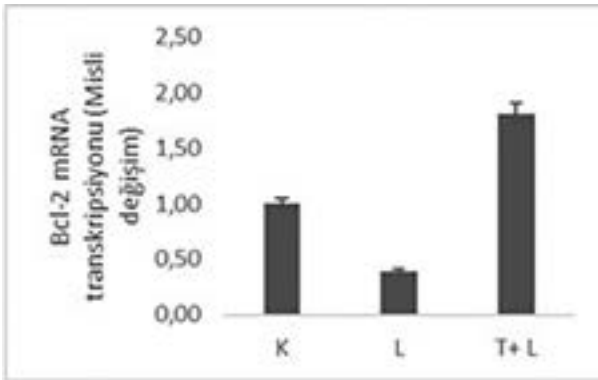
Şekil 4. Deneme gruplarındaki Kaspaz 3 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Ayrıca, α -terpineol uygulanan grupta kontrol grubuna göre Bax ekspresyonunun 14 kat baskılandığı tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS'in Bax düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.78 kat arttırdığı bulundu. Alfa-terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta ise bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında 11.4 kat misli değişimlerle baskılandığı ortaya konuldu (Şekil 5).



Şekil 5. Deneme gruplarındaki Bax gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

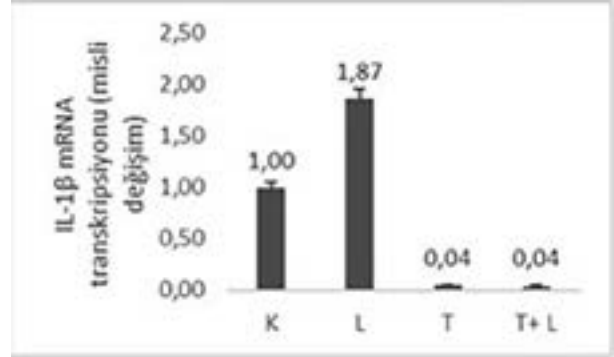
Çalışmada, gen ekspresyon analizlerine göre LPS uygulanımı Bcl-2 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.6 kat azaltırken α -terpineol ile birlikte LPS uygulanımı bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında 4.6 kat misli değişimlerle arttırdığı ortaya konuldu (Şekil 6).



Şekil 6. Deneme gruplarındaki Bcl-2 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

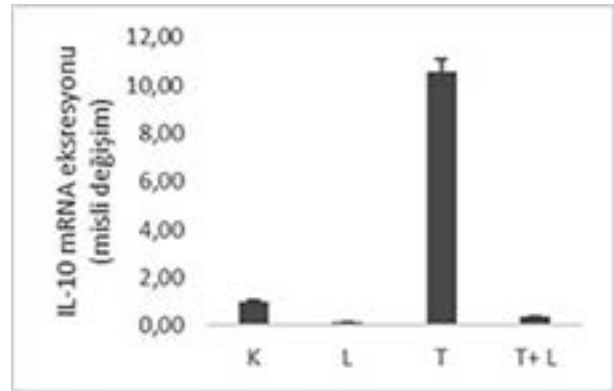
Bunun yanı sıra, α -terpineol uygulanan grupta kontrol grubuna IL-1 β ekspresyonu 25 kat baskılanırken LPS'in IL-1 β düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 1.87 kat uyardığı bulundu. Alfa-terpineolün LPS ile uygulandığı grupta ise bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıl-

dığında yaklaşık 50 kat misli değişimlerle baskılandığı tespit edildi (Şekil 7).



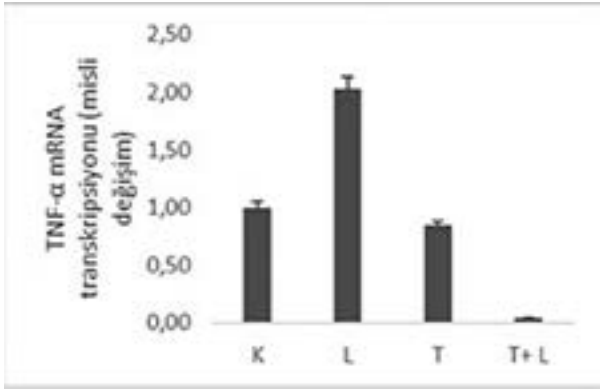
Şekil 7. Deneme gruplarındaki IL-1 β gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Alfa-terpineolün kontrol grubuna göre IL-10 ekspresyonunu 10.56 kat arttırdığı tespit edildi. Çalışmada gen ekspresyon analizlerine göre etkin konsantrasyondaki LPS'in IL-10 düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 8.33 kat azalttığı bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında yaklaşık 3.08 kat misli değişimlerle uyardığı ortaya konuldu (Şekil 8).



Şekil 8. Deneme gruplarındaki IL-10 gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

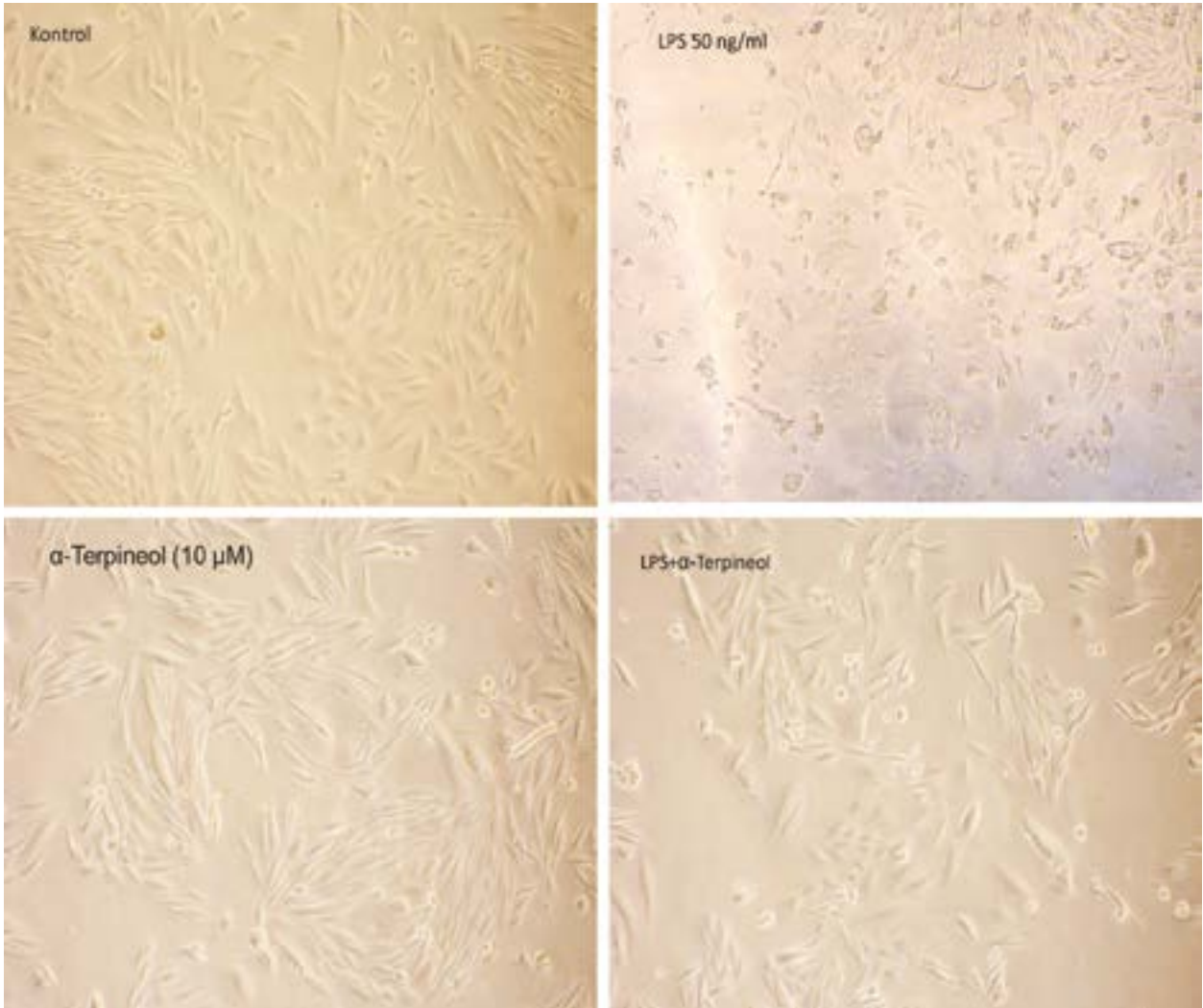
Araştırmada etkin konsantrasyonda α -terpineolün kontrol grubuna göre TNF- α ekspresyonunu 1.19 kat azalttığı tespit edilirken, LPS'in TNF- α düzeyini kontrol grubuna göre yaklaşık 2.03 kat arttırdığı bulundu. Bununla birlikte α -terpineolün LPS ile aynı zamanlı uygulanan grupta bu gen ekspresyon düzeyinin sadece LPS uygulanan grupla karşılaştırıldığında yaklaşık 50 kat misli değişimlerle baskılandığı ortaya konuldu (Şekil 9).



Şekil 9. Deneme gruplarındaki TNF-α gen ekspresyonu düzeyleri (24 saat).

Hücre Görüntüleri

Karaciğer hücrelerine LPS ve α-terpineol'ün 24 saat maruziyeti sonrası çalışma gruplarındaki hücreler invert mikroskopun (Olympus CK40,JP) 20x objektifiyle görüntüledi (Scala bar 1-50 nm.) Çalışmada kontrol hücrelerinin morfolojilerinin normal hepatosit yapısında oldukları ve flask tabanına homojen yayıldıkları görülmektedir. LPS uygulanan grupta hücrelerin morfolojik olarak deformasyona uğradığı ve bununla birlikte yoğun hücre kayıplarının olduğu görülmektedir. Çalışmada yalnız α-terpineol eklenen grup hücrelerinin gerek morfoloji gerekse de yoğunluk olarak kontrol hücrelerine yakın olduğu görülmektedir. Diğer bir sonuç, LPS+terpineol grubu sadece LPS uygulanan gruptaki hücrelerle kıyaslandığında, LPS'in meydana getirdiği morfoloji ve yoğunluk değişimlerini dikkate değer bir şekilde iyileştirdiği görülmektedir (Şekil 10).



Şekil 10. LPS ve α-terpineol uygulanan hücre görüntüleri (20 x, skala bar 1-50 nm).

Tartışma ve Sonuç

Son 10 yılda yapılan birçok çalışmada, bağırsak mikrobiyotası ile obezite /insülin direnci arasında nedensel bir bağlantı kurulmuştur. Ayrıca diyetle indüklenen obezitenin bağırsak mikrobiyotasına bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla insülin direncini arttırdığı da bilinmektedir. Bağırsak florası bakterilerinden gelen LPS, TLR4 aktivasyonu ile insülin direncine yol açan kronik subklinik inflamatuvar süreci başlatmakta ve obeziteye sebep olmaktadır. Araştırmamızda elde ettiğimiz hücre canlılık testlerinde etkin konsantrasyonda LPS'in hücre kayıplarına neden olduğu, ancak yine etkin konsantrasyonda uygulanan α -terpineol'ün bu kayıpları anlamlı derecede azalttığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte literatür tarandığında tespit ettiğimiz etkin konsantrasyonun (10 μ M) birçok çalışmaya göre kısa süreli kullanımı ve daha düşük konsantrasyonda olduğu görüldü. Birçok çalışmada, α -terpineol'ün çalışmamızdakinden yüksek konsantrasyonlarda uygulananının göreceli olarak karaciğer yağlanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Örneğin; Choi ve ark. (2013); yaptıkları *in vivo* çalışmada farelere 2 hafta süreyle 100 μ g/ml konsantrasyonda oral olarak α -terpineol verdiklerinde karaciğer dokusunda yağ infiltrasyonu olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda viyabilite analizleri verilerine benzer olarak, birçok çalışmada LPS'in farklı hücre tiplerine sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Stone ve ark. 2003; Nishio ve ark. 2013; Shi ve ark. 2016; Ting ve ark. 2019). Konu ile ilgili literatür tarandığında hücre canlılık testi sonuçları büyük oranda homoloji göstermektedir.

Araştırmada LPS'in karaciğer hücrelerinde pro inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve TNF- α) gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde uyardığı tespit edildi. Çalışmada diğer bir sitokin olan ve anti inflamatuvar yanıtta rolü bulunan IL10 ekspresyonu LPS tarafından baskılanmıştı. Yine araştırmada yangı parametrelerindeki bu olumsuz tablo α -terpineol tarafından anlamlı düzeyde iyileştirildiği de görüldü. Çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının çeşitli mekanizmalar yoluyla NAFLD'ye katkıda bulunduğunu göstermektedir (Chalasanı ve ark. 2018). Bunlar enerji homeostazının düzenlenmesi için kısa zincirli yağ asitleri karbonhidrat fermantasyonu yoluyla karaciğerde de novo lipogenezi indüklenmesi (Lucas ve ark. 2018) endokannabinoid sistemin modülasyonu (Armstrong vd. 2014); çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ve karaciğer lipid ihracatının sentezi için gerekli kolin metabolizmasının modülasyonu (Ashtari ve ark. 2015); safra asidi homeostazının modülasyo-

nu (Buzzetti ve ark. 2016); endojen etanol oluşumu ve (Mazzotti ve ark. 2016) karaciğer makrofajlarında pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini aktive eden ve hepatositlerin iltihaplanmasına neden olan lipopolisakkaritin (LPS) artışı olarak sıralanabilir (Poeta ve ark. 2017). Gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşeni olan LPS'in, TNF- α ve IL-6, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX2) ve nükleer faktör-kappaB gibi birçok enflamatuvar aracı molekülün ekspresyonu için sinyalleme kaskatını başlattığı bilinmektedir (Rossol ve ark. 2011). Bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak bariyeri bozulma olaylarının özünde PRR'lerin aktivasyonu ile IL-1 IL, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretiminin ve ekspresyonunun uyarılması bulunmaktadır (Buzzetti ve ark. 2016). Aynı zamanda, enflamasyonu, metabolizmayı, hücre canlılığını ve çeşitli sitokinlerin üretimini düzenleyen nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B)'nin hücre içi enflamatuvar yolunu aktive eder. Hem TNF- α hem de NF- κ B aktive edilir ve birlikte insülin direncini arttırırlar ve karaciğer iltihabına katılırlar (Duarte ve ark. 2015). Sitokin salınımının yanı sıra, TLR aktivasyonu; NF- κ B hücre içi enflamatuvar yolunu uyararak, insülin direncine ve obeziteye neden olan makrofajların stimülasyonunu indükler (Chakraborti 2015). İnsülin direnci ve obezite varlığı, vücut tarafından daha fazla serbest lipid metaboliti üretildiği ve daha fazla pro-inflamatuvar sitokinlerin dolaştığı anlamına gelir. Pro-inflamatuvar sitokinler ve lipotoksikite faktörleri hepatositlerde inflamasyon, apoptoz ve fibrozisin gelişmesine katkıda bulunur (Buzzetti ve ark. 2016).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı'nda NF- κ B aktivasyonunun en çok parankimal olmayan hücrelerde görüldüğü, TNF- α , IL-1 β ve diğer sitokinlerin aktivasyonu yoluyla hücrelerde pro-enflamatuvar yolların uyarımı gerçekleştiği bilinmektedir (Dela Peña ve ark. 2005). Sousa ve ark. (2020); α -terpineol enantiyomerlerinin yüksek yağlı diyet uygulanan farelerde antioksidan ve antienflamatuvar etkilerini araştırdıkları çalışmada 50mg/kg α -terpineol'ün pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β serum düzeylerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Cintira ve ark. (2008); yaptıkları fare NAFLD modelinde, antikor veya antisens oligonükleotitler kullanılarak IL-10 inhibisyonunun, karaciğerdeki TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu uyardığı ve insülin direncini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yine, Nogueira ve ark. (2014); yaptıkları makrofajlarda α -terpineol'ün özellikle LPS uyarımlı proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve TNF- α artan düzeylerini baskıladığını rapor etmişlerdir. α -terpineol'ün enflamatuvar medyatörlerin üretimini baskıladığı ve bu etkiyi NF- κ B, p38 veya ERK/MAPK

yalakları üzerinden gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Nogueira ve ark. 2014). Bir diğer çalışmada ise De Oliveira ve ark. (2012); α -terpineolün sitokin kaskadını inhibe ettiği, TNF- α ve IL-1 β gibi enflamatuar medyatörlerin üretimini azalttığı ve NO salımını inhibe ettiği, böylelikle de antienflamatuar ve antihipernositif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Araştırmamızda karaciğer hücrelerinde LPS'in kaspaz 3 ve bax gibi proapoptotik parametreleri uyardığı, bununla birlikte anti apoptotic olan Bcl-2gen ekspresyonunu ise baskılayarak hücre kayıplarına neden olduğu tespit edildi. Yine koruyucu etken madde olarak α -terpineol'ün bu olumsuz durumu geri çevirerek hücreleri kurtardığı da yapılan gen ekspresyon analizleriyle ortaya konuldu. İnflamatuar yanıt faktörleri hücre içi NF κ B ve AP-1 aktivasyonuna neden olarak TNF- α transkripsiyonunu tetikler ve apoptoz sürecinin başlamasına neden olur (Bubici ve ark. 2004). Zhu ve ark. (2006); LPS gibi faktörlerin uyarımıyla TNF- α reseptörüne bağlandığında kaspaz 3'ü dolaylı olarak kaspaz 8 üzerinden uyabildiği gibi doğrudanda uyararak mitokondriyal membran permeabilitesini bozarak sitokrom c'nin sitoplazmaya translokasyonunu uyararak intrinsik apoptozu tetiklediğini rapor etmişlerdir. Bax proteininin mitokondriye translokasyonu apoptozda kritik bir adımdır (Valentijn ve ark. 2003). Bax genelde sitozolda bulunur. Ancak apoptoz sürecinde protein Bcl2/Bcl xl proteinleriyle interaksyona girerek onların mitokondriye geçişlerini engeller (Capano ve ark. 2002). Zhang ve ark. (2007); yaptıkları çalışmada nöron hücrelerine uyguladıkları TNF- α 'nın bax stimülasyonuna neden olarak apoptozu indüklediklerini rapor etmişlerdir. Pourbakhsh ve ark. (2014); yaptıkları etanol uyarımlı karaciğer harabiyeti modelinde içeriğinde terpineol bulunan *Nigella sativa* bitkisinin esansiyel yağlarının Bax ekspresyonunu baskılayarak, Bcl-2 ekspresyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada ekstrinsik apoptozunda baskılanmasında esansiyel yağların kaspaz 8'i baskılayarak etki gösterdiğide rapor edilmiştir. Araştırmanın tüm verileri dikkate alındığında karaciğer hücrelerinin LPS ile maruziyeti sonrası inflamasyon ve buna bağlı olarak apoptoz gelişmiştir. Bununla birlikte hücrelere proliferatif etkin konsantrasyonda uygulanan α -terpineol'ün ise inflammatuar yanıt sitokinlerini baskılayarak yangıyı önlemiş ve buna bağlı olarak apoptozu engellediği görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde α -terpineolün mikrobiyota patojenleri tarafından meydana getirilen yangı ve hücre kayıplarına karşı alternatif bir etken madde olarak kullanılabileceği kanısına varıldı. Bununla birlikte literatür tarandığında, tes-

pit ettiğimiz proliferatif etkin konsantrasyonun (10 μ M) birçok çalışmaya göre kısa süreli kullanımı ve daha düşük konsantrasyonda olduğu görüldü. Birçok çalışmada, α -terpineol'ün çalışmamızdakinden yüksek konsantrasyonlarda uygulananın göreceli olarak karaciğer yağlanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Ancak konunun tam aydınlatılabilmesi ve ortaya konulabilmesi için in vivo ve ileri düzey araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu çalışmanın yapılması amacıyla Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05/09/2019 tarihinde (toplantı no:11, karar sayısı:15) etik kurul izni alınmıştır.

Teşekkürler: Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından 13/09/2019 tarihinde (toplantı no:20, karar sayısı:87) alınan kararlar doğrultusunda tez çalışması olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. (2014) Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 59, 1174–1197.
- Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Zali MR. (2015) Non-alcohol fatty liver disease in Asia: prevention and planning. *World J Hepatol*. 7, 1788–1796.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H. (2001) *Common Fragrance and Flavor materials: Preparations, properties, and uses*. Fourth edition. New York: Wiley online books.
- Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finaly-Jones JJ, et al. (2001) The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm. Res*. 50(4), 213–219.
- Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. (2004) NF-kappaB and JNK: An intricate affair. *Cell Cycle*. 3, 1524–9.
- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 65, 1038–1048.
- Capano M and Crompton M. (2002) Biphasic translocation of Bax to mitochondria. *Biochem J*. 367, 169–78.
- Chakraborti CK. (2015) New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 6, 110–119.
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ. (2018) The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 67, 328–357.
- Choi Y, Sim WC, Choi HK, Lee S, Lee BH. (2013) α -Terpineol induces fatty liver in mice mediated by the AMP-activated kinase and sterol response element binding protein pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 55, 129–136.
- Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ and Velloso LA. (2008)

- Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology*. 48, 628–637.
- De Oliveira MG, Marques RB, de Santana MF, Santos AB, Brito FA, Barreto EO, De Sousa DP, Almeida FR, Badauê-Passos D Jr, Antonioli AR, Quintans-Júnior LJ. (2012) α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 111(2), 120-5.
- Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. (2005) NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology*. 129, 1663–1674.
- Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JI, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. (2015) How inflammation impinges on NAFLD: a role for Kupffer cells. *BioMed Res Int*. 2015, 984578.
- Hassan SB, Muhtasib HG, Goeransson H, Larsson R. (2010) Alpha-terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signaling. *Anticancer Res*. 30(6), 1911-1920.
- Held S, Schieberle P, Somoza V. (2007) Characterization of alpha-terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. *J. Agric. Food Chem*. 55(20), 8040-8046.
- Hirsova P and Gores GJ. (2015) Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 1, 17–27.
- Khaleel C, Tabanca N, Buchbauer G. (2018) α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chem*. 16: 349–361.
- Kucukgul A and Erdogan S. (2014) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects lung epithelial cells against H₂O₂-induced inflammation and oxidative stress. *HealthMED*. 8(3), 329-338.
- Lampronti I, Saab AM, Gambari A. (2006) Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int. J. Oncol*. 29(4), 989-995.
- Lucas C, Lucas G, Lucas N, Krzowska-Firych J, Tomasiewicz K. (2018) A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol*. 4, 165–174.
- Machado MV and Diehl AM. (2016) Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 150, 1769–77.
- Mazzotti A, Caletti MT, Sasdelli AS, Brodosi L, Marchesini G. (2016) Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: lifestyle-gut-gene interaction. *Dig Dis. Suppl* 1, 3–10.
- Nishio K, Horie M, Yoko MA, Hitoshi S, Yoshihisa I, Yasukazu H, Niki YE. (2013) Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biology*. 1(1):97-103.
- Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa JC, Spolidorio DMP. (2014) Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm. Res*. 63, 769–778.
- Poeta M, Pierri L, Vajro P. (2017) Gut-liver axis derangement in non-alcoholic fatty liver disease. *Children (Basel)*. 4(8), 66.
- Pourbakhsh H, Taghiabadi E, Abnous K, Timcheh Hariri A, Hosseini SM, Hosseinzadeh H. (2014) Effect of Nigella sativa fixed oil on ethanol toxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 17(12), 1020-1031.
- Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. (2011) LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology*. 31(5), 379-446.
- Sabino CK, Ferreria-Filho ES, Mendes MB, Da Silva-Filho JC, et al. (2013) Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. *Flavour Frag. J*. 28(5), 333-339.
- Sales A, Felipe LO, Bicas JL. (2020) Production, Properties, and Applications of α -Terpineol. *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-020-02461-6.
- Sell C. (2003) A Fragrant Introduction to terpenoid chemistry, 1st ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Shi H, Yang YG, Binlin L, Xiaoyu SG, Lu YJS. (2016) The in vitro effect of lipopolysaccharide on proliferation, inflammatory factors and antioxidant enzyme activity in bovine mammary epithelial cells. *Animal Nutrition*. 2, 99-104.
- Sousa GM, Cazarin CBB, Maróstica Junior MR, et al. (2020) The effect of α -terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high-fat diet. *Heliyon*. 6(4), e03752.
- Stone WL, Qui M, Smith M. (2003) Lipopolysaccharide enhances the cytotoxicity of 2-chloroethyl ethyl sulfide. *BMC Cell Biology*. 4, 1-7.
- Ting Ge Y, Zhong AQ, Xu GF, Lu Ying. (2019) Resveratrol Protects BV2 Mouse Microglial Cells Against LPS-induced Inflammatory Injury by Altering the miR-146a-5p/TrAF6/NF- κ B Axis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 41(5), 549-557.
- Valentijn AJ, Metcalfe AD, Kott J, Streuli CH, Gilmore AP. (2003) Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J Cell Biol*. 162, 599-612.
- Wolff A. 1904. Über Grundgesetze der Immunität. *Zentralbl Bakteriol*. 37, 390–397.
- Yang H, Young DW, Gusovsky F and Chow JC. (2000) Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated tolllike receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem*. 275, 20861–20866.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 64, 73–84.
- Zhang L, Xing D, Liu L, Gao X, Chen M. (2007) TNF- α Induces Apoptosis Through JNK/Bax-Dependent Pathway in Differentiated, but not Naïve PC12 Cells. *Cell Cycle*. 6(12), 1479-1486.
- Zhu J, Liu M, Kennedy RH, Liu SJ. (2006) TNF α -induced impairment of mitochondrial integrity and apoptosis mediated by caspase-8 in adult ventricular myocytes. *Cytokine*. 34, 96-105.



Klinik semptomlu tavuk ve hindilerden patojen *Mikoplazma* türlerinin multipleks PCR ile tanımlanması

Ayfer Güllü Yüce^{1*}, Ahmet Murat Saytekin², Osman Yaşar Tel³,
Sevil Erdenli⁴, İrfan Özgünlük⁵, Oktay Keskin⁶

^{1,2,3,4,6} Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

⁵ Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 03.03.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 27.05.2022

Özet: Bu çalışmada amaç, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synovia* (MS) ve *Mycoplasma meleagridis* (MM) etkenlerini bir multipleks PCR yöntemiyle tek seferde tanımlamak ve bu yöntemin rutin teşhiste kullanılabilirliğini araştırmaktır. Çalışmada laboratuvara getirilen ve klinik belirtileri mikoplazma enfeksiyonları yönünden şüpheli, tavuk ve hindilerden aseptik şartlarda alınan toplam 100 swab örneği kullanıldı. Bu örnekler Frey's besiyerinde inkübe edildi ve buradan DNA ekstraksiyonu yapıldı. Yapılan multipleks PCR testi sonucunda tavuklarda (n=50) MG ve MS için sırasıyla 9 (%18) ve 5 (%10) pozitiflik saptandı. 2 tavukta (%4) hem MG hem de MS beraber pozitif bulundu. Tavuk numunelerinin hiçbirinde MM için spesifik bant oluşumu tespit edilmedi. Hindilerde ise (n=50) MG, MS ve MM için pozitif hayvan sayısı sırasıyla 6 (%12), 4 (%8) ve 3 (%6) olarak tespit edildi. MG ve MS bantlarının beraber tespit edildiği hindi sayısı 12 (%24) iken, 1 hindide (%2) MG ve MM, 3 hindide ise (%6) MM ve MS etkenleri beraber izlendi. Numunelerin hiçbirinde üç etkene ait spesifik bant oluşumu gözlenmedi. Sonuç olarak Şanlıurfa bölgesinde kanatlı türlerine ait önemli patojen mikoplazma etkenlerinin bulunduğu, multipleks PCR testi ile kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta çok sayıda etkenin aynı anda ve daha hızlı tespitinin sağlandığı ayrıca koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasında başarıyla kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: İdentifikasyon, kanatlı mikoplazmoz, multipleks PCR

Identification of pathogen *Mycoplasma* species using multiplex PCR from chickens and turkeys having clinical symptoms

Abstract: The aim of this study is to establish multiplex PCR method that enables to detect *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synovia* (MS) and *Mycoplasma meleagridis* (MM) species at the same time and to investigate usage of this method in routine diagnosis of these pathogenic mycoplasmas. A total of 100 swabs taken aseptically from chickens and turkeys which shows clinical symptoms similar to mycoplasma infection were used in the study. Samples were inoculated into Frey's medium and DNA extraction was made from these growing cultures. Nine (18%) and 5 (10%) out of 50 chickens were found positive for MG and MS, respectively by Multiplex PCR. Two chickens (4%) were positive for both MG and MS. No specific DNA for MM was detected in chickens. Six (12%), 4 (8%) and 3 (6%) out of 50 turkeys were detected as positive for MG, MS and MM, respectively. While MG and MS were detected together in 12 (24%) turkeys, MG and MM were found in only one (2%) turkey together. On the other hand, MM and MS were detected in 3 (6%) turkeys. None of the samples was found positive for all three species. As conclusion, we demonstrated the presence of pathogenic poultry mycoplasmas in chicken and turkeys in Şanlıurfa. It was also concluded that multiplex PCR is very useful method that detects different mycoplasmas with high sensitivity in a short time. Therefore, we assumed that this method could be used successfully in prevention and control of these pathogenic mycoplasmas of poultry.

Keywords: Avian mycoplasmosis, identification, multiplex PCR

Giriş

Mollicutes sınıfı, *Mycoplasmataceae* ailesinde yer alan mikoplazmalar, prokaryotların en küçük üyesidir. Sığırlarda bulaşıcı bir hastalık olan kontagiyöz ploröpnömoninin etkeni olarak ilk defa 1898 yılında izole edilmişlerdir. Solunum sistemine yerleşen etkenler, sonraki yıllarda plöropnömoni ben-

zeri organizma (PPLO) olarak tanımlanmıştır (Davis ve ark. 1973; Mendonça ve ark. 2000). Kanatlılarda patojenik mikoplazma etkenlerinin meydana getirdiği mikoplazmoz ilk olarak hindilerde 1926 yılında, daha sonra da tavuklarda 1936 yılında tanımlanmıştır (Charlton ve ark. 1996). Günümüzde, kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan farklı mikoplazma etkenlerinin olduğu bilinse de (Çarlı 2019; OIE 2021),

Yazışma adresi / Correspondence: Ayfer Güllü Yüce, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa-Türkiye e-posta: ayfergullu@harran.edu.tr

ORCID IDs of the authors: 10000-0002-9842-3305 • 20000-0001-7486-8054 • 30000-0001-7848-3899
• 40000-0002-0377-2650 • 50000-0002-6003-8612 • 60000-0002-5977-7872

kanatlılarda baskın olarak bulunan mikoplazma türleri, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synovia* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) ve *Mycoplasma iowae* (MI) dır (Songer ve Post 2012). Tavuk ve hindilerde MG ve MS, hindilerde ise MM ve MI, ticari kanatlı işletmelerinde, önemli ekonomik kayıplara yol açan patojenik mikoplazma türleri olarak bildirilmiştir. (Bradbury 2001). Bu etkenlerden de MG ve MS, epidemiyolojik olarak en önemli türlerdendir ve özellikle evcil kanatlılarda meydana getirdikleri hastalıkların tüm dünyada yaygın olması yönüyle, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) listesinde de yer almaktadır (OIE 2021). MG, tavuklarda kronik solunum yolu hastalığı (Chronic Respiratory Disease, CRD), hindilerde ise infeksiyöz sinüzitis (IS) olarak bilinen hastalık tablolarını oluşturur. MS ise tavuk ve hindilerde infeksiyöz synovitis ve kanatlılarda üst solunum yolları problemlerine neden olmaktadır. MS ayrıca, yumurtacı tavuklarda yumurta verimini ve kalitesini de bozar (Çarlı 2019). Bu hastalıklar tavuk ve hindilerde önemli ekonomik kayıplara yol açarlar (Charlton ve ark. 1996). MM ise ilk defa 1965 yılında hindilerin hava kesesi infeksiyonlarından tanımlanmış, hindilerde ve diğer kanatlılarda patolojik lezyonlar oluşturabilen, fakat tavuklarda patolojik lezyonlara sebep olmayan bir mikoplazma türü olarak belirlenmiştir (Yamamoto ve ark. 1965). Etken, genç hindilerde solunum yolları hastalığına neden olurken bunun yanında, gelişmenin durması, zayıf tüylenme ve ayak problemleri ile de ilişkili bulunmuştur (Songer ve Post 2012).

Kanatlılardaki mikoplazma infeksiyonlarının, direkt temasla, etkeni içeren dışkı ve akıntılar, toz, damlacıklar, kontamine ekipman, yem, su, infekte kuşlar, rodent ve etkeni içeren gübrelerle horizontal olarak bulaşabileceği çevresel numunelerden yapılan analizler ve deneysel bir kurguyla gösterilmiş, ayrıca damızlık anaçların yumurtalarından civcivlere ise vertikal olarak bulaşabileceği ve sürü içinde çok hızlı bir yayılım gösterebileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Marois ve ark. 2002). Bulaşma gücü yüksek bu etkenlerin tanısı ve infeksiyonun teşhisi bu noktada oldukça önemlidir. Mikoplazmaların tanısında klasik kültür metodu, altın standart yöntem olarak kabul edilmiş olsa da, serolojik metodlar ve moleküler olarak da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), teşhiste sıklıkla tercih edilmektedir. Kültür yönteminin uzun sürmesi ve kontaminasyon riskinin yüksek olması, serolojik testlerde ise çapraz reaksiyonlar sonucu hatalı pozitif veya negatif sonuçların alınması, etkenlerin teşhisi aşamasında PCR temelli moleküler tanı yöntemlerini, diğerlerine göre daha kullanışlı hale getirmektedir (Marois ve ark.

2002; Buim ve ark. 2009; OIE 2021). İnfeksiyondan şüphe edilen canlı veya yeni ölmüş hayvanlardan ya da öldükten hemen sonra dondurulmuş hayvanlardan, doku, organlar ve solunum yolu eksudatlarından svab alınarak, mikoplazmaların tanısı için inceleme örneği olarak kullanılabilir (Marois ve ark. 2002; Kleven ve ark. 2004; OIE 2021).

Bu çalışmada amaç, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarına getirilen, anamnez ve klinik belirtilerine göre mikoplazmoz şüpheli tavuk ve hindilerde MG, MS ve MM etkenlerini bir multipleks PCR testiyle saptamak ve bu yöntemin patojen kanatlı mikoplazmalarının rutin teşhisinde kullanılabilirliğini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Klinik örnekler

Bu çalışmada, 2020 yılı Temmuz ayından, 2021 yılı Aralık ayına kadar geçen süre içerisinde, Mikrobiyoloji Ana bilim dalı laboratuvarına canlı veya agoni halinde getirilen evcil kanatlılardan, çok hafiften şiddetliye değişen derecelerde "semptom gösteren" anamnez, klinik semptomlar ve nekropsi bulguları yönünden mikoplazmoz şüpheli (öksürük, nazal ve oküler akıntı, infraorbital sinüste şişme, yumurta veriminde düşüklük, bacak problemleri, iştahsızlık semptomları ile nekropside hava kesesi yangısı, perikardit, perihepatit, sinüzit ve bazen artrit lezyonları, çeşitli yaş (7- 36 haftalık) ve cinsiyetteki 50 tavuk ve 50 hindinin, canlı olanlarından ağız-burun akıntıları ve trakealarının üst bölgelerinden, nekropsi yapılanlarından ise ilave olarak trakealarının derin bölgelelerinden, lezyonlu organlardan ve hava keselerinden, aseptik şartlarda alınan svab örnekleri etken tanısı amacıyla inceleme örneği olarak kullanıldı (OIE 2021).

Kültür

Frey *Mycoplasma* Broth Base (Himedia), üretici firmanın tavsiyesine uygun olarak 500 ml olarak hazırlandıktan sonra otoklav ile 121°C de 15 dk steril edildi. Besiyeri 50-55°C'ye soğutulduktan sonra besiyerine, steril şartlarda, *Mycoplasma* Supplement G (Oxoid), son konsantrasyonu %20 olacak şekilde at serumu (Himedia) ve %1 oranında Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) (Merck) (Öngör ve ark. 2009) ilave edilerek Frey's besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri, 3 ml olarak steril cam tüplere taksim edildi. Taksim sonrası, olası kontaminasyonların tespiti için gerekli kontroller yapıldı ve hazırlanan tüpler kullanılıncaya kadar 4°C' de muhafaza edildi. Hayvanlardan alınan svablar besiyerine ekildi ve daha sonra

her bir kanatlı için bu besiyerleri 37 °C'de, mikroaerobik şartlarda, 72 saat inkübasyona bırakıldı (Frey ve ark. 1968; OIE 2021).

DNA ekstraksiyonu

Ekimleri yapılan ve inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, inkübasyon sonunda DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla steril ependorf tüplerine 1.5 ml sıvı kültür besiyeri alındı. Süspansiyon, 14.000 x g'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım dikkatlice alınarak atıldı ve pelet 25 µl ultra saf su ile süspansiyon edildi. Tüpler, 10 dk kaynatıldıktan sonra buz üzerinde soğumaya bırakıldı. Daha sonra 14.000 x g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve DNA'nın bulunduğu süpernatant kısım alınarak test edilene kadar -20°C'de saklandı (Liu ve ark. 2001; Tomar ve ark. 2017a).

Referans DNA' lar

MG, MS ve MM için referans DNA'lar, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Mikoplazma OIE Referans Laboratuvarından temin edilerek çalışmalarda pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

Multipleks PCR

Tek seferde, 3 farklı etkene spesifik 3 gen bölgesinin araştırılması amacıyla örneklerle multipleks PCR uygulandı. Yöntemde ticari master mix (Qiagen, 206143) kullanıldı.

MG, MS ve MM için tür spesifik primerler (Tablo 1) 100 µM konsantrasyonda (100 pmol/µl) olacak şekilde steril ve DNaz / RNaz free PCR grade su ile sulandırıldı ve stok konsantrasyonlar hazırlandı. Her bir primer için son konsantrasyon 2 µM (2 pmol/µl) olacak şekilde kullanıldı.

Multipleks PCR karışımı, her bir tüp için toplam hacim 25 µl olacak şekilde belirlendi. Bunun için 12,5 µl Qiagen master mix, 2,5 µl primer karışım, 9 µl su ve 1 µl kalıp DNA içerecek şekilde hazırlandı. Karışım içeriği, Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Arktik) cihazında çoğaltıldı. Amplifikasyon için döngüler, ticari master mix içeriğine uygun olarak yapıldı. Bu amaçla 95°C'de 15 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra toplam 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 30 saniye (denatürasyon), 58°C'de 90 saniye (ilk bağlanma), 72°C'de 3 dakika (ilk sentez) ve döngülerin sonunda, 72°C'de 10 dakika (son sentez) tutularak amplifikasyon tamamlandı. DNA'ların yürütülmesi için amplikonlar elektroforeze tabi tutuldu (Thermo Scientific EC300 XL). Bu amaçla 10 X TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (Fermentas, B49), distile su ile sulandırılarak 1X oranında kullanıldı. Agaroz jel (Sigma, A9539), %2 konsantrasyonda hazırlandı. DNA marker olarak 2000 bp'lik ladder (Qiagen Gel Pilot Mid Range) kullanıldı. İşlemlerin sonunda görüntüleme işlemi (Jel görüntüleme Major Science UVCI-1100) ile yapılarak spesifik bantların varlığı araştırıldı.

Tablo 1. MS, MM ve MG tanısı için multipleks PCR testinde kullanılan primerler.

Hedef Mikroorganizma	Kullanılan primerler	Gen Bölgesi	Amplikon boyutu (bp)	Referans
Mycoplasma synoviae (MS)	F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3' R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'	16S rRNA	211 bp	(OIE 2021)
Mycoplasma meleagridis (MM)	90F: 5'-CGAGCGAAGTTTTTCGGAAC-3' 469R: 5'-GGTACCGTCAGGATAAATGC-3'	16S rRNA	424 bp	(Boyle ve ark. 1995)
Mycoplasma gallisepticum (MG)	F: 5'-GGAGTTAGCTTTGTGTCTCGG-3' R: 5'-AAGTTCATGCGGTTTGGACC-3'	mgc2	750-800 bp	(Rajkumar ve ark.2019)

Minimum tespit limitinin belirlenmesi

Kullanılan multipleks PCR'nin minimum tespit limitini belirleyebilmek için her 3 etkene ait referans DNA'ların miktarları spektrofotometrik olarak ölçüldü (Thermo, NanoDrop1000) ve DNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde karıştırıldı. Oluşturulan stok karışım, mikrolitresinde 50ng, 25ng, 10ng, 100pg, 10pg DNA içerecek konsantrasyonlarda sulandırılarak multipleks PCR'de tespit limitinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı (Wang ve ark. 1997; Mettifo ve ark. 2015).

Bulgular

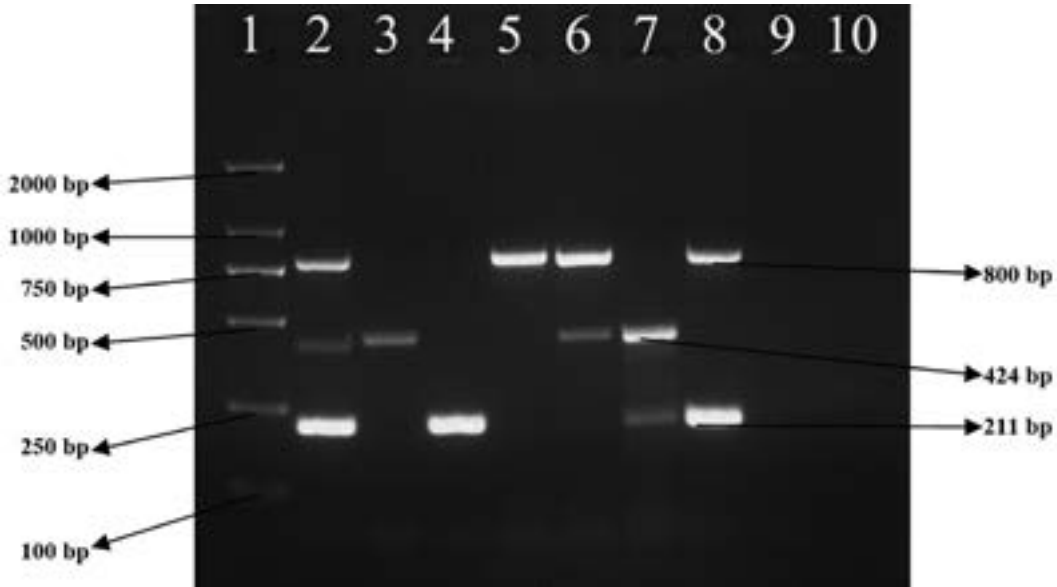
Tavuk numunelerinin multipleks PCR analizi sonucunda, 50 tavuğun 16'sında (%32) incelenen etkenlerden en az birine ait spesifik bant oluşumu tespit edildi. Bu etkenler içinde, 9 tavuk (%18) MG için pozitif bulunurken, MS için 5 tavuk (%10) pozitif bulundu. Hem MG hem de MS'nin beraber bulunduğu 2 pozitif hayvan (%4) tespit edildi. Tavuk numunelerinin hiçbirinde MM için spesifik bant oluşumu tespit edilmedi (Şekil 1, Şekil 2).

Hindi numunelerinin multipleks PCR analizi sonucunda, 50 hindinin 29'unda (%58) araştırılan et-

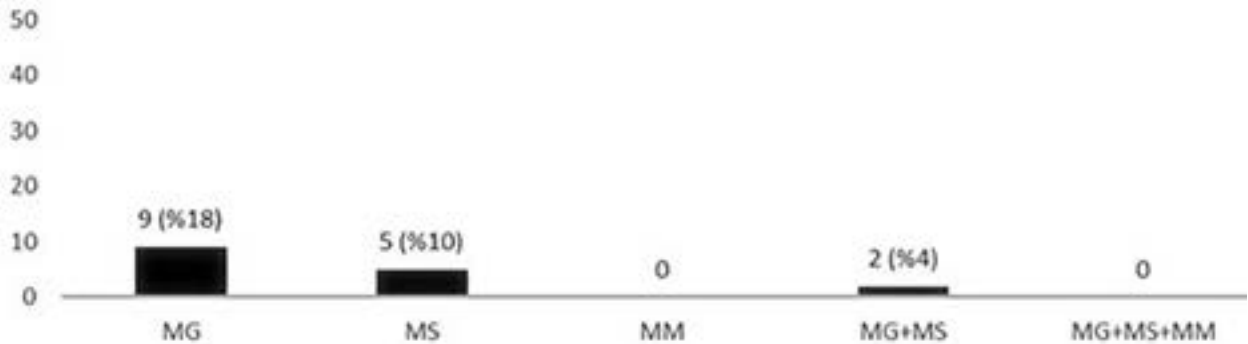
kenlerden en az birisine ait spesifik bant oluşumu izlendi. Test edilen 50 hindi içinde, MG, MS ve MM için pozitif hayvan sayısı sırasıyla 6 (%12), 4 (%8) ve 3 (%6) olarak bulundu. Aynı hayvanda, birden çok etkenin beraber bulunduğu sonuçlar değerlendirildiğinde, MG ve MS etkenlerine ait spesifik bantlar 12 hayvanda (%24) bulunurken, MG ve MM etkenlerine ait spesifik bantlar sadece 1 hindide (%2), MM ve MS etkenlerine ait spesifik bantlar ise 3 hayvanda

(%6) görüldü. Numunelerin hiçbirinde, üç etkene ait spesifik bant oluşumu beraber izlenmedi (Şekil 1, Şekil 3).

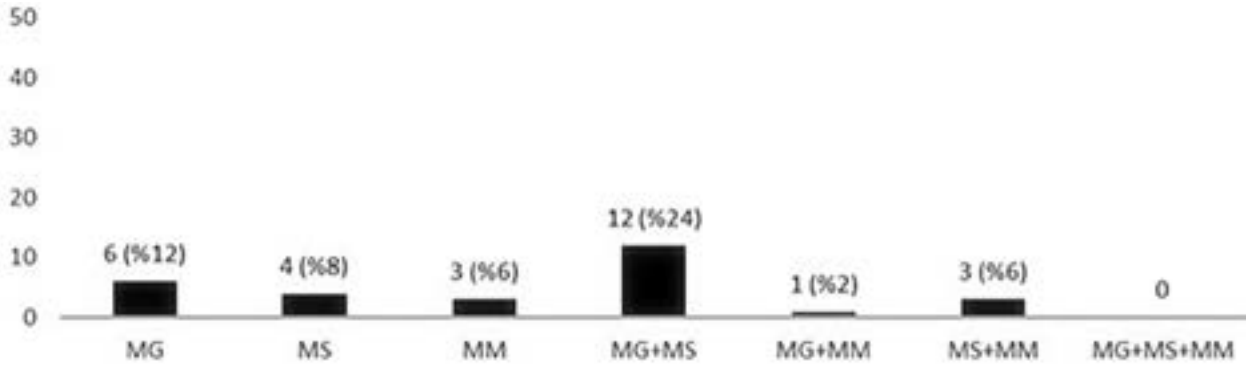
Minimum tespit limitinin belirlenmesi için yapılan çalışmanın sonucunda, mikrolitrede 10ng DNA konsantrasyonu, kullanılan multipleks PCR için her 3 etkenin de beraber tanımlanabileceği en düşük miktar olarak tespit edildi (Şekil 4).



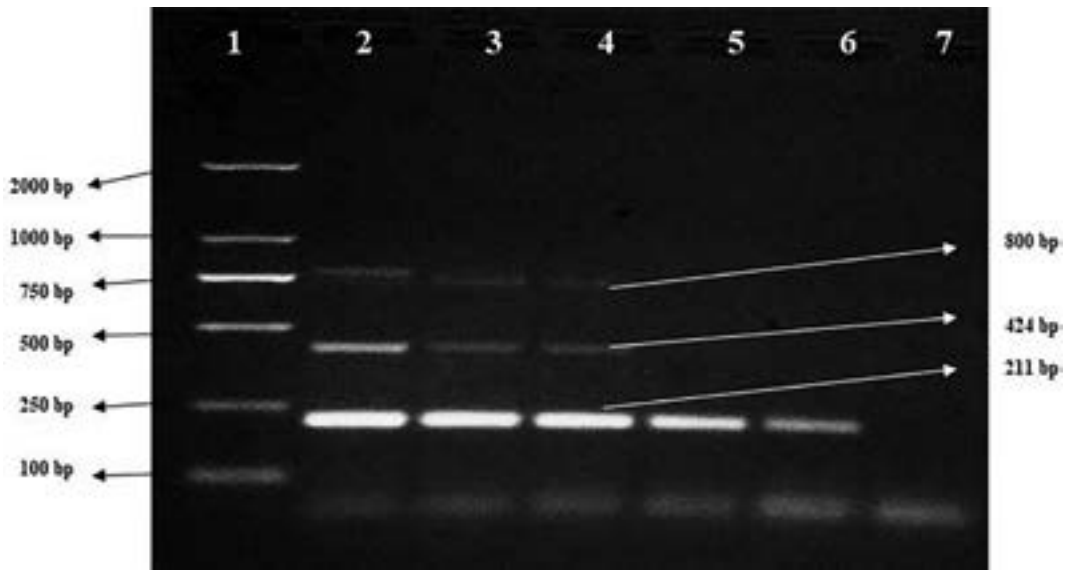
Şekil 1. Multipleks PCR testi sonucunda örneklerin jel elektroforez görüntüsü 1- Marker (Mid range ladder 2000bp) 2- Referans DNA'ları içeren Miks Pozitif kontrol, 3- MM pozitif numune 4- MS pozitif numune 5- MG pozitif numune 6- MG+MM pozitif numune 7- MM+MS pozitif numune 8- MG+MS pozitif numune 9- Negatif kontrol



Şekil 2. Tavuk numuneleri için (n=50) multipleks PCR bulguları grafiği.



Şekil 3. Hindi numuneleri için (n=50) multipleks PCR bulguları grafiği.



Şekil 4. Multipleks PCR testi ile minimum tespit limitinin belirlenmesi için elde edilen jel elektroforez görüntüsü 1- Marker (Mid range ladder 2000bp) 2- 50ng DNA konsantrasyonu 3- 25ng DNA konsantrasyonu 4- 10ng DNA konsantrasyonu 5- 100 pg DNA konsantrasyonu 6- 10 pg DNA konsantrasyonu 7- Negatif kontrol

Tartışma ve Sonuç

Araştırmacılar patojenik mikoplazma türlerinden MG için tavuklarda CRD, hindilerde ise IS ye neden olan ve ayrıca sülün, keklik, tavus kuşu ve bıldırcınlarda da enfeksiyonlara yol açan, subklinik enfeksiyonlarda özellikle de tavuklarda *Avibacterium paragallinarum*, enfeksiyöz bronşitis virusu ve *Escherichia coli* ile ko-enfeksiyonlar oluşturarak sonuçta büyük kayıplara yol açabilen bir mikoplazma türü olduğunu, ayrıca MG'ye bağlı enfeksiyonların, diğer kanatlı mikoplazma enfeksiyonları içinde, kanatlı sektöründeki damızlık, yumurtacı ve broyler işletmelerinin en önemli enfeksiyonları olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar, MS için tavuk ve hindilerde enfeksiyöz sinovitis ve üst solunum yollarında hastalıklara se-

bep olabileceğini, diğer bakteriyel ve viral etkenlerle ve bazen de MI ile miks enfeksiyonlar oluşturarak şiddetli hastalık tablolarına sebep olduğunu bildirmişlerdir. MM için araştırmacılar, etkenin sadece hindilerde hastalık oluşturan bir tür olduğunu, diğer spesifik mikoplazma türlerine benzer şekilde hindilerin hava keseleri, trakea ve sinüslerinden rahatlıkla izole edilebileceğini vurgulamışlardır (Çarlı 2019). Araştırmacıların da bildirdiği gibi kanatlılarda oldukça ciddi enfeksiyonlara sebep olan bu mikoplazma etkenleri, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de kanatlı sektöründe önemli sorunlara yol açmaktadır (Esendal 2002; Akan 2008). Bu nedenlerle de bu çalışmada adı geçen etkenlerin araştırılması düşünülmüştür.

Mikoplazma infeksiyonlarını önceden tespit etmek, önlem almak, sürüleri ari duruma getirmek veya hasta sürülerde erken tedavi ve karantina uygulamaları yaparak kayıpları en aza indirebilmek için söz konusu patojen mikoplazma türlerinin tanısına yönelik çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Bunların içinde, klasik izolasyon ve identifikasyon yöntemi uluslararası yetkili otoriteler tarafından mikoplazmaların tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (Çarlı 2019; OIE 2021). Ancak bazı araştırmacılar, bu klasik yöntemle ilgili bazı dezavantajları bildirmişlerdir. Kleven (1998), mikoplazma etkenlerinin besiyerlerinde üretilmeleri sırasında, çok hassas olduklarını belirterek sıvı besiyerlerinde glukoz fermentasyonundan dolayı renk değişiminin tespiti yapılır yapılmaz kültürlerin bekletilmeden pasajlanması gerektiğini vurgulamıştır. Aksi durumda etkenlerin pH değişiminden dolayı ölebileceğini belirtmiştir.

Günümüzde kültür yöntemi yerine hızlı tanı için moleküler yöntemlerin kullanımı, oldukça yaygın ve avantajları sebebiyle çoğu araştırmacı ve tanı laboratuvarı tarafından tercih edilen, güvenilir teşhis yöntemleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Zakeri 2016; Çarlı 2019; OIE 2021). Öngör ve ark. (2009), besiyerinden yapılan PCR testinde, bakteriyel kontaminasyon olsa bile oldukça spesifik olarak mikoplazma etkenlerinin saptanabileceğini, bu şekilde de klasik kültür yöntemine kıyasla çok daha iyi sonuçlar alındığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, patojen etkenlerin tespitinde, asemptomatik belirti gösteren hayvanlardan veya antibiyotik tedavisi uygulanmış canlı hayvanlardan alınan klinik örneklerde ya da vücutta fagosite edilmiş halde bulunabilen mikoplazma etkenlerinin tespiti için alınan örneklerde, PCR testi ile etkenlerin araştırılmasının tanı açısından daha verimli olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca, PCR yöntemi ile patojen etkenin, konakçının immünolojik yanıtından önce saptanmasının mümkün olabileceği, böylece PCR yönteminin serolojik testlere göre daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Garcia ve ark. 1995; Kempf 1998; Gondal ve ark. 2015). Mikoplazmaların tanısı için yaptıkları çalışmalarda PCR testini başarılı olarak rapor eden geçmişten günümüze çok sayıda araştırmacı vardır (Zhao ve Yamamoto 1993; Boyle ve ark. 1995; Garcia ve ark. 1995; Marouf ve ark. 2020). Kesler ve ark. (2013), yumurtacı tavuklardan aldıkları örneklerin sıvı kültürlerinden yaptıkları PCR testinde, canlı hayvanlardan alınan 73 trakeal svabtan, 2 işletmeye ait 2 tavukta MG spesifik DNA'ların tespit edildiğini bildirmişlerdir. Tomar ve ark. (2017a), solunum yolu enfeksiyonlarının bulunduğu 92 farklı kanatlı sürüsünden, trakea, akciğer ve hava keselerini içeren doksan iki havuzlanmış doku örne-

ğinin toplandığını ve dubleks PCR ile mikoplazmalar için incelemeye tabi tutulduğunu bildirmişlerdir. Dubleks PCR sonucunda, %27 (25/92) oranında MG, %2,1 (2/92) oranında MS ve %1,08 (1/92) oranında hem MG hem de MS için pozitif sonuçlar aldıklarını, sonuç olarak, kullandıkları PCR testinin sürülerin taranması ve sürveyans için kullanılmasını tavsiye etmişler, böylece kanatlılarda patojenik mikoplazma etkenlerinin yaygınlığının belirlenerek hastalığın azaltılması ve vertikal bulaşmayı en aza indirmek için de gerekli kontrol önlemlerinin alınması gerekliliğini bildirmişlerdir. Tüm bu belirtilenler dikkate alınarak bu çalışmada da moleküler test yöntemlerinin söz konusu üstünlükleri değerlendirilmiş ve mikoplazma etkenlerinin tanısı için PCR testi tercih edilmiştir.

Araştırmacılar çok sayıda mikoplazma etkeninin tek seferde analiz edilebileceği multipleks PCR testleri dizayn ederek tanı açısından iş yükü, maliyet ve zaman konusunda avantaj elde etmeye çalışmışlardır. Garcia ve ark. (1995), MG, MS ve MI için tür spesifik multipleks PCR dizaynını, etkenlerin bilinen 16S ribosomal RNA (rRNA) bölümlerine özgü primerler kullanarak yaptıklarını bildirmişlerdir. Wang ve ark. (1997), spesifik dört mikoplazma etkeni için multipleks PCR geliştirmişler ve optimize ettiklerini bildirmişlerdir. Mettifofo ve ark. (2015), multipleks PCR tekniği ile patojen kanatlı mikoplazma etkenlerinin tespit edilmesinde düşük reaktif hacimlerde, yüksek duyarlılık, özgüllük ve doğruluk gibi avantajları ile rutin teşhiste kullanılabileceğini, kanatlı çiftliklerinin izleme programlarında kullanılmak üzere kanatlı türlerinde multipleks PCR ile MG ve MS enfeksiyonuna neden olan mikoplazma türleri ve MG-F aşısı suşunun eşzamanlı olarak tespit edilebileceğini ve multipleks PCR testinin ayırıcı, hızlı, hassas ve spesifik bir tanı yöntemi olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir. Abd-El-Tawab ve ark. (2020), klinik örneklerle uyguladıkları multipleks PCR testinin MS ve MG'nin tek bir reaksiyonda eşzamanlı tespitinde duyarlı ve spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Avantajları sebebiyle bu çalışmada da spesifik patojen mikoplazma etkenlerinin en kısa sürede ve doğru olarak tespit edilebilmesi için bir multipleks PCR testi kurgulanmış ve kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla tanı için daha önceden çalışılmış ve başarısı kanıtlanmış primerler arasından bant yükseklikleri birbirinden oldukça farklı olan primerler tercih edilerek muhtemel etyolojik miks durumlarında, bant karışıklığının önüne geçilmiş, PCR için reaksiyon bileşenlerinin standart olduğu ticari bir multipleks PCR master miks kullanılarak da optimizasyon konusunda zaman kazanılmış ve büyük avantaj elde edilmiştir.

Bazı araştırmacılar, kurguladıkları multipleks PCR testlerinde, testlerin minimum tespit limitlerini de belirlemişlerdir (Wang ve ark. 1997; Stagenborg ve ark. 2006; Mettifo go ve ark. 2015). Bulunan değerler genel olarak 1pg ile 1ng DNA miktarı arasında bildirilmiştir. Kurgulanan bu çalışmada ise kullanılan multipleks PCR için 10ng DNA miktarı, her üç etkenin de beraber tespit edilebileceği en düşük DNA miktarı olarak belirlenmiştir. Bulunan bu rakam daha önceki benzer çalışmalara göre biraz yüksektir. Bunun sebebi, multipleks PCR reçetesinde kullanılan döngü sayısının, oluşabilecek non spesifik bantların önlenmesi için düşük tutulmasına bağlı olabilir.

Çok sayıda araştırmacı, klinik semptomlu kanatlılarda mikoplazmaların PCR testi ile tanısı için çalışmalar yapmıştır. (Tomar ve ark. 2017a; Abd-El-Tawab ve ark. 2020; Shingade ve ark. 2020). Bu çalışmada da klinik olarak semptom gösteren kanatlılardan patojen mikoplazma etkenlerinin muhtemel identifikasyonu için tespit oranı artırılmış, uygulanan multipleks PCR testinin tanı performansı incelenmiştir. Ayrıca klinik semptomlu kanatlıların seçilmesi, uyguladığımız multipleks PCR testi açısından "çeşitli mikroorganizmaların bulunduğu ve daha karmaşık bir mikrobiyal ortamdan" spesifik mikoplazma etkenlerinin tanısı için doğal çalışma olanağı sunmuştur. Elde edilen sonuçlar, uyguladığımız multipleks PCR testinin, benzer çalışmalar için de tanı amacıyla kullanılabilirliğini göstermiştir. Bu çalışmayı farklı bir açıdan değerlendirecek olursak, benzer klinik semptomlara rağmen, negatif sonuçlanan multipleks PCR testleri de, semptomların farklı enfeksiyöz nedenlerle oluşabileceğini ve bunların da aslında azımsanmayacak çoğunlukta olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple benzer klinik tabloları oluşturan diğer hastalıklar yönüyle de çalışmaların yapılması, önlemlerin belirlenmesi açısından yararlı olacaktır. Ayrıca bu çalışmada, sadece mikoplazma etkenleri araştırılmış, mikoplazmalarla ko-enfeksiyon yapan diğer etkenlerin tespiti için çalışılmamıştır. Ancak fakültemize getirilen kanatlılarda görülen çok hafiften ağıra olacak şekilde klinik tablo farklılıkları, mikoplazmaların içinde olduğu enfeksiyonların aslında farklı etkenlerle de miks olabileceğini, klinik tablonun da bu sebeple değişken olabileceğini (Arda 1984; Kleven ve ark. 2004; Çarlı 2019) düşündürmektedir. Bu konuda da ayrı bir çalışma yapılması, bölgede mikoplazmalara eşlik eden etkenlerin de tanımlanması, koruma ve kontrol tedbirleri için faydalı olabilir.

Araştırmacıların çalışmaları sonucunda, işletmelerde ve/veya aynı hayvanda, birden çok patojen mikoplazma etkeninin olabileceği bildirilmiştir. Tavuk ve hindilerde patojen mikoplazmaların miks enfek-

siyonlarının nadir görülemeyecek seviyede olduğu, özellikle hem MG hem de MS ile aynı anda enfekte olan ticari damızlık tavuk sürülerinin kültür, seroloji ve PCR testleri ile ayırt edilmesi ve teşhis edilmesi gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Bradbury ve McClenaghan, 1982, USDA, 1985). Buim ve ark. (2009) multipleks PCR tekniği ile yaptıkları epidemiyolojik çalışmada, solunum problemleri kanatlıların bulunduğu yumurtacı tavuk çiftlikleri, ticari tavuk işletmeleri ve ticari kanatlı kümeslerinden aldıkları 1046 svab örneğinden MG, MG-F ve MS etkenlerini aynı anda tespit etmişler, bu oranları yumurtacı tavuk çiftliklerinde %27.27, ticari tavuk işletmelerinde %1.05, ticari kanatlı kümeslerinde ise %37.14 olarak belirlemişlerdir. Tomar ve ark. (2017a), yaptıkları çalışmada PCR testi ile aynı hayvana ait numunede 2 farklı mikoplazma etkenini miks olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Abd-El-Tawab ve ark. (2020), solunum belirtilerinin olduğu kanatlı hayvan işletmelerinde, MS ve MG tespiti için yaptıkları çalışmada, etkenlerin aynı işletmede beraber bulunabileceklerini belirterek, böylece işletmelerde her iki etkeninde olduğu miks enfeksiyonların hakim olduğunu göstermişlerdir. Marouf ve ark. (2020), çalışmalarında bir yumurta kesesi örneğinden elde ettikleri izolatların PCR analizini yapmışlar, aynı anda MS ve MG etkenlerinin her ikisi için pozitif sonuç aldıklarını, böylece her iki enfeksiyonun aynı anda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da, uyguladığımız multipleks PCR testiyle çok sayıda ve aynı hayvanda bulunmak üzere miks mikoplazma türlerinin (2'li miksler) varlığı belirlenmiştir. Bu durum, çok çeşitli patojen mikoplazma etkenlerinin aynı işletmede olmasını akla getirmektedir. Miks oranının yüksek olması, örneklerimizin rastgele değil, klinik semptomlu hasta hayvanlardan temin edilmiş olmasıyla birlikte test edilen bu kanatlıların geldiği, bölgemizde faaliyet gösteren profesyonel olmayan işletmelerin, başka bir ifadeyle halk elindeki kanatlı işletmelerinin yönetim eksikliklerine bağlı olabilir.

MG ve MS etkenlerinin tespiti için yapılan araştırmalarda, kanatlı hayvanlarda bulunma oranları açısından etkenler için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Abd-El-Tawab ve ark. (2020), yapmış oldukları çalışmanın sonunda, MS'yi, tavuklarda en sık görülen mikoplazma etkeni olarak tespit etmişlerdir. Paralel olarak Rajkumar ve ark. (2018), farklı bölgelerden toplam 26 kanatlı sürüsünde (n=309) MG ve MS enfeksiyonunun hala önemli bir sorun olduğunu ve PCR ile tespit edilen prevalansın MS için %33, MG için %11.65 bulunduğunu ve MS prevalansının daha yüksek seyrettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Tomar ve ark. (2017a), uyguladıkları dubleks

PCR sonucunda, %27 oranında MG, %2.1 oranında MS için pozitif sonuç aldıklarını belirterek MG için yaygınlığı göstermişlerdir. Marouf ve ark. (2020), çoğunluğunu tavukların oluşturduğu değişik türden kanatlılardan aldıkları numunelerde, PCR testi ile yürüttükleri çalışmalarında, MG için %53.7, MS için %24.3 oranında pozitif sonuç elde etmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada ise, MG varlığı tavuklarda küçük bir farkla daha yüksek oranda tespit edilirken, hindilerde ise MG ve MS etkenlerinin varlıkları eşit miktarda tespit edilmiştir. Araştırmacıların sonuçları arasında farkların oluşmasında örnekleme yapılan hayvan sayılarının da etkili olduğu düşünülmektedir. Tomar ve ark. (2017b), bu hususla ilgili yaptıkları değerlendirmede, MG ve MS için mikoplazmoz prevalansının düşük veya yüksek olmasını numune tipine, numune toplama mevsimine, numune alma yöntemine, sürveyans programındaki farklılığa, hastalığın vertikal bulaşmasına ve kanatlı çiftliklerinde sürveyans programının olmamasına bağlamaktadır. Türkiye'deki kanatlılarda, mikoplazma etkenlerine yönelik yapılan benzer çalışmalarda, etkenlerin bulunma sıklığının %8.3 ile %16.3 oranları arasında seyrettiği belirtilmiştir (Ülgen 1991, Akan 2008). Bu çalışmada bulunan sonuçlar, tavuklarda %32, hindilerde ise %58 dir. Bu oranlar, daha önce belirtilen oranların üzerindedir. Bunun sebebi, yukarıda anlatılan ve etkenlerin tespit edilebilirliklerindeki oransal farklılıklara sebep olan faktörler olabileceği gibi, ilave olarak, bu çalışmada klinik semptomlu ve profesyonel olmayan halk elindeki kanatlıların tanı için seçilmiş olmasından ve ayrıca bu çalışmanın bölgesel bir nitelik taşıyor olmasından da kaynaklanabilir.

Genel olarak MM, hindilere özgü bir patojen olarak kabul edilmiş (Yamamoto 1965; Kleven 2003; Öngör ve ark. 2009; Çarlı 2019), MM ve MI etkenlerinin hindilerdeki varlığı çok sayıda çalışmada araştırılmış, bu amaçla PCR testi yoğun olarak kullanılmıştır. Zhao ve Yamamoto (1993), yaklaşık 850 bp büyüklükte bant veren MM spesifik primerler kullanarak, 17 MM ve diğer kanatlı mikoplazma türlerinden 16'sı ile PCR testi yapmışlar, sonuç olarak testin oldukça hassas olduğuna vurgu yaparak tanı da kullanılabileceğini çalışmalarında bildirmişlerdir. Boyle ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada, hindilerde spesifik etkenler olarak kabul edilen MM ve MI için sırasıyla 424 bp ve 427 bp büyüklüğünde bant oluşturan, söz konusu etkenlerin 16S rRNA bölgesinden primerler geliştirdiklerini ve bu primerlerle birlikte saha izolatları ve referans suşların tanısı için çalışmalar yaptıklarını, sonuçta uyguladıkları PCR analizi ile kültür metodunun aynı sonuçları verdiğini, bu şekilde PCR kullanımının kültür yöntemine göre

çok kısa zamanda ve avantajlı olarak tanıyı sağlayacağını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da MM için 424 bp büyüklüğünde bant veren primerler seçilmiş ve diğer araştırmalarda tavsiye edildiği gibi tanı için kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Ayrıca kullandığımız multipleks PCR testi, kurguladığımız şekli değiştirilmeden, MM için spesifik primer çiftini de içerecek şekilde, sadece hindilerden alınan inceleme örneklerine değil, tavuklardan alınan inceleme örneklerine de uygulanmış, ancak MM sadece hindilerde tespit edilmiştir. Tavuk numunelerinde bu etkene rastlanılamamıştır. Bu sonuç daha önce yapılan ve çoğu araştırmacının belirttiği şekilde genel kabule uygun olarak etkenin hindilere özgü olduğu sonucunu desteklemektedir. Ancak tüm bu bilinenlerin aksine Khiari ve ark. (2011), bir hindi yetiştirme ünitesinin yakınında bulunan ve klinik mikoplazmoz belirtileri gösteren (solunum sistemi semptomları ve performans düşüklüğü) tavuklarda yaptıkları araştırmada, aldıkları trakeal sürüntülerden ilk defa olmak üzere 10 adet MM saha suşunu klasik kültür yöntemi kullanarak izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu durum araştırmalarda tavukların da MM enfeksiyonları açısından değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. Çalışmamızda, MM spesifik primer içeren PCR test kurgusunun tavuklar için değiştirilmemiş olmasının ve etkenin tavuklarda da araştırılmasının bir sebebi de bu durumdur.

Bazı araştırmacılar, MM ve MI etkenlerinin kümeslerde vertikal olarak bulaşması ve hindi konakçılarına özgü olmalarına rağmen, diğer patojenik mikoplazma etkenlerine oranla daha az rastlanıldığını ve hatta bazı batı Avrupa ülkelerinde endemik seviyede kaldığını belirtmişlerdir (Miller 1994; Stipkovits ve Kempf 1996) Bu çalışmadaki bulgular da önceki çalışmalara uygun olarak diğer etkenlere oranla az sayıda MM tespitiyle sonuçlanmıştır.

Bu çalışma sonucunda, Şanlıurfa bölgesindeki kanatlı hayvanlarda patojenik mikoplazma etkenlerinin mevcudiyeti, kanatlı türlerindeki dağılımı ve bölgedeki semptom gösteren kanatlılarda mikoplazma enfeksiyonunun yaygınlığı hakkında ön bilgiler edinilmiştir. Tanı yöntemi olarak dizayn ettiğimiz multipleks PCR testi için, daha önce çalışılmış ve güvenilir primerler seçilerek ve ticari bir multipleks master miks kullanılarak optimizasyon ve standardizasyon problemleri büyük oranda ortadan kaldırılmıştır. Ancak alınan sonuçlar her ne kadar sorunsuz olarak karşımıza çıksa da, bu testin rutin tanı testi olarak güvenle kullanılması için diğer testlerde olduğu gibi, sensitivite ve spesifitesinin belirlenmesinin yanında, validasyonu için de çalışmaların kurgulanması oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, kurgulanan multipleks PCR ile MM, MS ve MI etkenlerinin moleküler tanısı, direkt sıvı besiyerlerinden ve aynı anda olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tavuk numunelerinin %32'sinde, hindi numunelerinin ise %58'inde en az bir mikoplazma etkeni tanımlanabilmiştir. Üç farklı mikoplazma türünün çalışıldığı evcil kanatlılarda, bu 3 etkenin miks olduğu herhangi bir duruma rastlanılamamıştır. Miks enfeksiyonlar açısından en fazla MG+MS birlikteliğine rastlanılmış, etkenler tek olarak ele alındığında ise her iki kanatlı türünde de ilk sırada MG, daha sonra da MS etkeni baskın mikoplazma türleri olarak tespit edilmiştir. MM etkeninin varlığına sadece hindilerde rastlanılmıştır. Bu çalışma ile Şanlıurfa bölgesindeki işletmelerde mikoplazma enfeksiyonlarının mevcudiyeti belirlenerek hastalık için bir farkındalık oluşturulmuş, tehlikenin boyutları hakkında öngörü sahibi olunmuştur. Enfeksiyonların engellenmesi, bulaşmanın önüne geçilmesi ve hastalıkla mücadele edilmesi için ivedilikle önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu çalışmada etik kurul iznine gerek yoktur.

Teşekkür: Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü OIE Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı Şefi Dr. Ümit Özdemir'e katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Abd-El-Tawab AA, Hassan WMM, El-ordy MS. (2020). Detection of virulence factors of *Mycoplasma* species isolated from chicken by multiplex PCR. *BVMJ*. 38, 61-65.

Akan M, İzgür M, Sareyyüpoğlu B, Çiftçi A, İça T. (2008). Tavuklarda Solunum Sistemi Hastalıklarının Epidemiyolojisi. Ankara Üniv. BAP Projesi-Ankara.

Arda M, İzgür M. (1984). Kanatlılarda Mikoplazma enfeksiyonları. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 5, 124-137.

Boyle JS, Good RT, Morrow CJ. (1995). Detection of the turkey pathogens *Mycoplasma meleagridis* and *M. iowae* by amplification of genes coding for rRNA. *J Clin Microbiol.* 33, 1335-1338.

Bradbury JM, McClenaghan M. (1982). Detection of mixed mycoplasma species. *J Clin Microbiol.* 16, 314-318.

Bradbury JM. (2001). Avian mycoplasmosis. Jordan F, Pattison M, Alexander D, Faragher T, eds. *In Poultry diseases*. Fifth edition. WB Saunders, New York, p. 178-193.

Buim MR, Mettifofo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJP. (2009). Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesqui Vet Bras.* 29, 552-556.

Carlı KT. (2019). Bakteri Enfeksiyonları. Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları. Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, p. 215-352.

Charlton BR, Bermudez AJ, Boulianne M, Eckroade RJ, Jeffrey JS, Newmann LJ, Sander JE, Wakenell PS. (1996). Avian Disease Manual American Association of Avian Pathologists

Poultry Pathology Laboratory University of Pennsylvania, Pennsylvania.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB. (1973). *Infecções bacterianas e micóticas*. São Paulo (SP). *Edart*. 1-9.

Esendal Ö. (2002). Mikoplazma enfeksiyonları. İzgür M, Akan M. eds. *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*. Medisan, Ankara, p.79-85.

Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. (1968). A ~Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res.* 29, 2163-2171.

Garcia M, Jackwood MW, Levisohn S, Kleven SH. (1995). Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis.* 39, 606-16.

Gondal MA, Rabbani M, Muhammad K, Yaqub T, Babar ME, Sheikh AA, Ahmad A, Shabbir MZ, Khan MI. (2015). Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolated From Commercial Poultry Flocks. *JAPS.* 25, 108-113.

Kempf I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.* 27, 7-14.

Kesler K, Güler L, Orhan G. (2013). Yumurtacı tavuk işletmelerinde *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun çabuk serum aglütinasyon, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle araştırılması. *Eurasian J Vet Sci.* 29, 76-81.

Khiari AB, Landoulsi A, Aissa H, Mlik B, Amouna F, Ejlassi A, Mardassi BBA. (2011). Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from chickens. *Avian Dis.* 55, 8-12.

Kleven SH. (1998). Mycoplasmosis: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, JE Pearson, Reed WM, eds. *American Association of Avian Pathologists*. Fourth edition. Kennett Square, Pennsylvania, p. 74-80.

Kleven SH. (2003). Mycoplasmosis. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. Eleventh edition. Iowa State University Press, Ames, IA, p. 719-721.

Kleven SH, Jordan FTW, Bradbury JM eds. (2004). *Avian Mycoplasmosis: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Fifth edition. Paris: Office International des Epizooties, p.1-24.

Liu T, Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven S. (2001). Molecular variability of the adhesion-encoding Gene pvp Among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 39, 1882-1888.

Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I (2002). Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.* 31, 163-168.

Marouf S, Moussa IM, Heba Salem H, Sedeik M, Elbestawy A, Hemeg HA, Dawoud TM, Mubarak AS, Mahmoud H, Alsubki RA, Bahkali AH. (2020). A picture of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Egypt: Phenotypic and genotypic characterization. *Journal of King Saud University - Science.* 32, 2263-2268.

Mendonça GA, Nascimento ER, Lignon GB, Nascimento MGF, Polo PA. (2000). PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) em galinhas poedeiras vacinadas com MG-F e com doença respiratória. *Braz J Poult Sci.* 2, 83.

Mettifofo E, Buzinhani M, Buim MR, Timenetsky J, Ferreira AJP. (2015). Evaluation of a PCR multiplex for detection and differentiation of *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, and *M. gallisepticum* strain F-vaccine. *Pesqui Vet Bras.* 35, 13-18.

Miller O. (1994). Mycoplasmosis: national survey of commercial poultry flocks. In Proc. 43rd Western Poultry Diseases Conference, March 27-February 1, Sacramento, California.

- OIE. (2021). Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, p. 482-496.
- Öngör H, Kalın R, Karahan M, Çetinkaya B, Akan M. (2009). Detection of mycoplasma species in turkeys by culture and polymerase chain reaction, *Rev Sci Tech off Int Epiz.* 28, 1103-1109.
- Rajkumar S, Reddy MR, Somvanshi R. (2018). Molecular prevalence and seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in Indian poultry flocks. *J Anim Res.* 8, 15-19.
- Rajkumar S, Reddy MR, Somvanshi R (2019). Molecular typing of Indian *Mycoplasma gallisepticum* isolates. *Indian J Anim Res.* 53, 1645-1650.
- Shingade AA, Gandge RS, Majee SB, Zende RJ, Pharande RR, Ingle SA. (2020). Detection of *Mycoplasma* spp. from Choanal and Tracheal Samples using Genus Specific Polymerase Chain Reaction. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 9, 1099-1108.
- Songer JG, Post KW. (2012). Hücre Duvarı Olmayan Bakteriler. Anđ Ö, Yakut Özgür N, eds. *Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, p. 39, 305-317.
- Stakenborg T, Vicca J, Butaye, P, Imberechts H, Peeters J, De Kruif, A, Haesebrouck F, Maes D. (2006). A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. *Vet Res Commun*, 30, 239-247.
- Stipkovits L, Kempf I. (1996). Mycoplasmoses in poultry: an overview. In *Animal mycoplasmoses and control. Rev sci tech Off int Epiz.* 15, 1495-1525.
- Tomar P, Singh Y, Mahajan NK, Jindal N, Singh M. (2017a). Duplex PCR for direct detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* from tissues of poultry affected with respiratory infections. *Int J Livest Res.* 7, 280-286.
- Tomar P, Singh Y, Mahajan NK, Jindal N, Sing M. (2017b). Molecular Detection of Avian Mycoplasmas in Poultry Affected with Respiratory Infections in Haryana (India). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 6, 2155-2162.
- US. Dept. of Agriculture. (1985). National poultry improvement plan and auxiliary provisions. USDA, *Bulletin*, p. 91-40.
- Ülgen M. (1991). Kanatlıların Kronik Solunum yolu enfeksiyonu üzerinde karşılaştırılmalı bakteriyolojik ve serolojik araştırmalar. Doktora Tezi. UÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Wang H, Fadl AA, Khan MI. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *MCP.* 11, 211-216.
- Yamamoto R, Bigland CH, Ortmayer HB. (1965). Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* sp. isolated from turkeys. *JB.* 47-49.
- Zakeri A. (2016). Polymerase Chain Reaction of *mgc2* and 16S rRNA Genes for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *IJAS.* 6, 59-65.
- Zhao S, Yamamoto R. (1993). Detection of *Mycoplasma meleagridis* by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 36, 91-97.



Sıcaklık stresindeki bıldırcınlarda probiyotik uygulamasının ovidukt ve ovaryum morfolojisine etkileri

Özge Yıldırım^{1*}, Sadık Serkan Aydın², Ömer Korkmaz³, Deniz Korkmaz⁴, İsmail Demircioğlu⁵,
Nurcan Kırar⁶, Şermin Top⁷, Tuğra Akkuş⁸, Birten Emre⁹, Ali Tekçe¹⁰

^{1,3,8,9,10} Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD. Şanlıurfa, Türkiye.

^{2,6,7} Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD. Şanlıurfa, Türkiye.

⁴ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji ABD. Şanlıurfa, Türkiye.

⁵ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi ABD. Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 19.04.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 24.05.2022

Özet: Sunulan çalışmanın amacı sıcaklık stresinin bıldırcınlarda, yumurta üretimi ve yapılandırılmasının gerçekleştiği organlar olan, ovaryum ve ovidukt üzerine morfolojik etkisi ve bu etkinin probiyotik ile giderilmesini araştırmaktır. Bu amaçla 40 adet dişi yumurtacı Japon bıldırcını (*Coturnix coturnix Japonica*) rastgele dört gruba ayrıldı. Birinci grupta ortam sıcaklığı sekiz hafta boyunca tüm gün 14-25°C'de tutuldu. İkinci gruptaki bıldırcınların içme suyuna 14-25°C'de tutulduğu süre boyunca fermente edilmiş doğal LAB (Laktik Asit Bakteri) sıvısı 0,5 cc/L düzeyinde ilave edildi. Üçüncü grupta kümes ortamı günde 8-12 saat 30-34°C'de tutulacak şekilde sıcaklık stresi oluşturuldu. Dördüncü gruptaki bıldırcınların içme suyuna sıcaklık stresine maruz bırakıldığı sekiz hafta boyunca 0,5 cc/L düzeyinde fermente edilmiş doğal LAB sıvısı ilave edildi. Sonuç olarak bıldırcınlarda ovidukt bölümlerinden magnum ve isthmus uzunlukları arasında güçlü bir negatif ilişki gözlemlenmiştir. Sıcaklık stresi altındaki bıldırcınlarda sarımsı folikül sayısının ve ortalama sarı folikül çaplarının küçüldüğü ölçülmüştür. Sıcaklık stresine maruz bırakılan bıldırcınlarda, probiyotik etkili fermente laktik asit bakterilerin yem katkı maddesi olarak uygulanmasının sarı folikül sayısının azalmasını ve canlı ağırlık kaybını engellediği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Coturnix coturnix Japonica*, Folikülogenezis, Ovidukt, Probiyotik, Sıcaklık Stresi.

Effects of probiotic application on oviduct and ovarian morphology in quails under heat stress

Abstract: The aim of the present study was to investigate the morphological effect of heat stress on the ovaries and oviducts in quails, the organs where egg production and structuring take place, and to eliminate this effect with probiotics. For this purpose, 40 Japanese quail (*Coturnix coturnix Japonica*) were randomly divided into four groups. The first group ambient temperature was kept at 14-25°C for eight weeks. During the quails in the second group were kept at 14-25°C, fermented natural LAB (Lactic Acid Bacteria) liquid was added to the drinking water (0,5 cc/L). In the third group, heat stress was created so that environment was kept at 30-34°C for 8-12 hours a day. In the fourth group were exposed to heat stress and LAB liquid was added to the drinking water. As a result, negative relationship was observed between the magnum and isthmus lengths. It was measured that the number of yellowish follicles and the mean diameter of yellow follicles decreased in quails under heat stress. In quails exposed to heat stress, the application of fermented LAB with probiotic effects as feed additives has been shown to reduce the number of yellow follicles and prevent live weight loss.

Keywords: *Coturnix coturnix Japonica*, Folliculogenesis, Heat Stress, Oviduct, Probiotic.

Giriş

Dünya nüfusu ile paralel artan hayvansal protein talebini karşılayabilmenin en etkili yollarından biri kanatlı hayvan yetiştiriciliğidir. Ülkemiz, kanatlı sektöründe dünyada 10. sırada olup (Omrak 2021) kanatlı hayvan sayımızın 400 milyona yaklaştığı bildirilmektedir (TÜİK 2021). Kanatlılarda yumurta veriminden

sorumlu başlıca iki organ ovaryum ve oviduktur. Ovaryum, her biri potansiyel yumurta olan çok sayıda folikülün ve yumurta sarısının yapımından sorumludur. Ovidukt ise ovaryumlarda üretilen yumurtanın nakledilmesinden, yumurta beyazı, şalaz ve çift zarın yapımından sorumlu kıvrımlı boşluklu bir organdır (Akbalık ve ark. 2016; Assersohn ve ark,

Yazışma adresi / Correspondence: Özge Yıldırım, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD. Eyyübiye/Şanlıurfa e-posta: ahuramazda@harran.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹10000-0002-6061-1933 • ²0000-0002-3252-3944 • ³0000-0001-5179-2181
• ⁴0000-0002-5739-3824 • ⁵0000-0002-0724-3019 • ⁶0000-0002-2778-1789 • ⁷0000-0003-2684-7798
• ⁸0000-0002-6002-5942 • ⁹0000-0001-8785-417x • ¹⁰0000-0002-1626-6626

2021). Kanatlı ovaryumundaki foliküller, renk ve çapına göre beyaz, sarımsı ve sarı folikül diye 3 gruba ayrılır (Johnson 2012; Anna 2021) Kanatlı oviduktu, fertilizasyonun gerçekleştiği infundibulum, yumurta akı (albümin) ve şalazın olduğu magnum, kabuk altı zarların olduğu isthmus ve sert kabuğun olduğu uterus olarak dört bölgeye ayrılır (Bakst 1998; Koyama ve ark. 2019).

Kanatlıların kendilerini rahat hissettiği ve verim olarak fonksiyonlarını optimum bir şekilde gerçekleştirebildiği sıcaklık (termal nötral bölge) 14-25 °C aralığındadır (Etches ve ark. 2008). Sıcaklık 25 °C'nin üzerinde ise ter bezlerinin bulunmaması, vücut yüzeyinin %95'inin tüylerle kaplı olması ve derilerinin içerdiği geniş yağ tabakası gibi sebeplerden kanatlılarda termoregülasyon yeterli sağlanamamakta ve sıcaklık stresi oluşmaktadır (Zhang ve ark. 2012). Sıcaklık stresinde canlı ağırlık, yumurta verim ve kabuk kalitesinin düşüklüğü gibi performansla yönelik parametreler olumsuz etkilendiğinden (Arslan 2012; Zhang ve ark. 2012; Song ve ark. 2014; Adanır 2019; Saleh ve ark. 2020) ciddi ekonomik kayıplar oluşmaktadır. Bıldırcınlarda sıcaklık stresi ile ilgili bilimsel çalışmalar giderek yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmaların çoğu verim kaybını azaltmak amacıyla yapılan rasyon değişikliği veya yem ve suya eklenen çeşitli katkı maddeleri ile ilgilidir (Tonbak 2012; Şentürk ve Uyanık 2016; Adanır 2019; İnci 2019; Cruvinel ve ark. 2020; Dosoky ve ark. 2021; Orhan ve ark. 2021). Bu katkılardan probiyotikler (uygun konsantrasyonda alındığında yararlı etkileri olan, patolojik olmayan mikroorganizmalar) tüketici talepleri göz önüne alındığında doğru bir alternatiftir (Sen ve ark. 2012; De Melo Pereira ve ark. 2018). Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyal denge, büyüme performansı, antimikrobiyal aktivite, villus-kript yapısının düzenlenmesi, aflatoksin ve stresin azaltılması, et kalitesinde iyileşme gibi pek çok kanıtlanmış olumlu özelliği mevcuttur (Tekçe ve ark. 2020).

Sıcaklık stresi altındaki kanatlılarda yem katkı maddesi olarak probiyotiklerin kullandığı çalışmalara bakıldığında (Jahromi ve ark. 2016; Fathi ve ark. 2017; Zhang ve ark. 2017; Chao ve ark. 2018; Cramer ve ark. 2018; Tekçe ve ark. 2020; Mofidi ve ark. 2021), yumurta veriminden başlıca sorumlu organlar olan ovaryum ve ovidukt üzerine etkilerinin çalışıldığı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Kanatlılarda sıcaklık stresinin genital sistem organlarında yol açtığı morfolojik değişiklikler hakkında sınırlı bilgiler mevcuttur. Sunulan çalışmada sıcaklık stresinin bıldırcınlarda ovaryum folikül dinamiği ve oviduktun morfolojik yapısı üzerindeki değişiklikleri ortaya koymak amaçlanmıştır. Ayrıca sıcaklık stresi altındaki

bıldırcınlarda probiyotik kullanımının ovaryum ve ovidukt üzerine morfolojik etkileri incelenerek elde edilecek ilk bulguların bu alanda yürütülecek diğer çalışmalara yön vermesi ve literatüre katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Materyali

Çalışmanın hayvan materyalinde 40 adet, 60 günlük dişi Japon bıldırcınlar (*Coturnix coturnix Japonica*) kullanıldı. Çalışmanın tüm aşamaları Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kanatlı Ünitesinde gerçekleştirildi. Deneme süresince (sekiz hafta) deneklere yem ve içme suyu adlibitum olarak verildi. Yem olarak tüm bıldırcınlara bitkisel yağ (2,65 kg), sert kırmızı kışkık buğday (15,05 kg), sarı mısır (45 kg), soya küspesi (%51, 28,2 kg), dikalsiyum fosfat (1,71 kg), dl-methionin (0,1 kg), kireç taşı (6,56 kg), l-lizin hidroklorid (0,01 kg), l-treonin (0,05 kg), sodyum bikarbonat (0,12 kg), tuz (0,25 kg), vitamin-mineral karması (0,30 kg) ile hazırlanan rasyon verildi. Gruplardaki deneklerin kümes ortamlarında gün ışığı ve yapay aydınlatma ile 16 saat aydınlık ve sekiz saat karanlık programı uygulandı. Beslenme, aydınlatma, sıcaklık gibi koşullar değiştirilmeden iki ay boyunca kesintisiz olarak sürdürüldü. Çalışma kapsamında ön çalışmalarımızın sonuçları ışığında probiyotik amacıyla sıvı formda, fermente edilmiş doğal laktik asit bakteri (LAB) sıvıları, %5 sükröz (Duchefa, S0809, Haarlem, Netherlands) katkısı ile, beş gün inkübasyona bırakılarak elde edildi ve inkübasyon sonrasında sıvı olarak kullanılacak fermente edilmiş LAB sıvıları kullanım süreleri boyunca bakterilerin çoğalamadıkları ancak yaşamlarını devam ettirdikleri 0 ile +4 °C aralığında muhafaza edildi.

Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmanın hipotezi gereği denekler rastgele dört gruba ayrıldı. Birinci grup termal nötral bölgedeki kontrol grubu bıldırcınlar olup (Grup TNK, n=10) ortam sıcaklığı sekiz hafta boyunca, tüm gün 14-25°C'de tutuldu. İkinci grup termal nötral bölgedeki probiyotik uygulanan (Grup TNP, n=10) bıldırcınlar olup birinci gruptaki gibi 14-25°C'de tutulduğu süre boyunca (sekiz hafta) fermente edilmiş doğal LAB sıvısı 0,5 cc/L düzeyinde içme suyuna ilave edildi. Üçüncü grup olan sıcaklık stresi kontrol grubunda (Grup SSK, n=10) kümes ortamı, sekiz hafta süresince, günde 8-12 saat 30-34°C'de tutulacak şekilde ayarlandı. Dördüncü grup sıcaklık stresi probiyotik grubu (Grup SSP, n=10) olup sıcaklık stresi kontrol grubundaki gibi günde 8-12 saat 30-34°C sıcaklık

stresine maruz bırakıldığı süre boyunca (sekiz hafta) 0,5 cc/L düzeyinde fermente edilmiş doğal LAB sıvısı içme suyuna ilave edildi.

Fermente Edilmiş LAB Sıvısının Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan LAB sıvısı hazırlanırken Masuko ve ark. (2002)'nin belirttiği yöntemle uyularak 1000 g taze çayırotuna 1000 ml saf su ilavesi sonrası karıştırıcı ile iki dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen karışım, iki kat tülbent bezinde süzölmüştür. Cam şişelere aktarılan bu süzöntüye %5 sükröz ilave edilerek beş gün boyunca 30°C'de anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır.

Fermente LAB Sıvısında Yapılan Mikrobiyolojik Analizler

Çalışmada probiyotik amaçlı kullanılacak LAB sıvısından mikrobiyolojik analizlerin gerçekleştirilebilmesi amacıyla her bir şişeden steril pipet yardımıyla 10 ml alınarak steril numune alma poşetlerine (Bag Filter, Fransa) bırakıldı. Daha sonra 90 ml %0,1'lik steril peptonlu su toplam aerob mezofilik bakteri (LABM) ilave edilerek stomacher cihazında (Easy Mix, Fransa) bir dakika homojenize edildi. Mikroorganizma sayısının belirlenmesi amacıyla %0,1'lik 9 ml peptonlu su bulunduran tüplerde 10-1'den 10-9'e kadar seri dilüsyonlar yapıldı. Laktik asit bakteri sayımı Aydın ve ark. (2008)'nin belirttiği şekilde gerçekleştirildi. Numunelerde maya-küf sayımı için ISO 21527-1:2008 talimatları esas alınarak ekim ve inkübasyon işlemleri gerçekleştirildi ve Brooks ve ark. (2012)'nin belirttiği gibi koloni sayımı yapıldı. Toplam Aerob Mezofilik Bakteri (TAMB) sayısı ise Alçay (2019)'ın belirttiği gibi hesaplandı. Enterobakter grubu bakterilerin sayımı Harrigan WF ve McCance ME (1976)'nin bildirdiği şekilde gerçekleştirildi. Koliform bakterilerin sayımında dökme plak yöntemine göre ekim yapılarak Sert ve Kivanç (1985)'in bildirdiği şekilde inkübasyona bırakılıp inkübasyon sonunda 0,5-2 mm çaplı koyu kırmızı ve genellikle etrafında kızılımtırak haleler oluşturan koloniler tipik koliform olarak sayıldı (Harrigan 1998).

Ovidukt ve Ovaryumun Morfolojik Değerlendirilmesi

Deneme süreci olan sekiz haftanın sonunda kesimi yapılan bıldırcınların ovaryum ve oviduktları çıkarıldı. Bıldırcın ovaryumlarında foliküller, beyaz renkli ve 1-4 mm çapında olanlar "beyaz folikül", sarımsı renkte ve 5-8 mm çapında olanlar "sarımsı folikül" ve sarı renkte ve 9-40 mm çapında olanlar "sarı folikül" olarak adlandırılarak sayıldı ve kaydedildi. Çıkarılan

ovaryumlardaki sarı foliküllerin genişlikleri ile ovidukt bölümlerinin morfolojik uzunluğu ve genişliği ImageJ programı ile mm cinsinden dijital olarak ölçüldü. Bunun için her bir deneğin genital sistemi sabit uzaklıktan (19,5 cm sabit uzaklık) fotoğraflanıp (Apple iPhone 11, 12 MP. 3024x4032, Geniş Kamera-26 mm f1.8) HEIF dosyası olarak kaydedildi. Programın mm cinsinden kalibrasyonu için fotoğrafta numunenin yanına konulan cetveldeki uzunluk birimi kullanıldı.

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistik analizleri için Statistical Package for the Social Sciences 24.0 paket programı kullanıldı. Değerlerin Shapiro-Wilk testi sonucunda normal dağılım gösterdiği anlaşıldı. Sayı, genişlik ve uzunluk bakımından gruplar arası farklılık olup olmadığı One-way ANOVA testi ile belirlendikten gruplar arası farklılığın istatistiki olarak anlamlılığı post-hoc Tukey testi ile ölçüldü. Ayrıca ölçülen değerler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile tespit edildi. İstatistiksel olarak gruplar arası fark, P değeri 0,05 ve altında olduğu durumlarda anlamlı olarak değerlendirildi.

Bulgular

Sunulan çalışmada %5 sükröz katkısı ile beş gün inkübasyon sonrası fermente edilmiş laktik asit bakteri sıvısında yapılan analizler sonucunda; laktik asit bakteri sayısı $7,6 \times 10^{10}$ kob/ml (mililitresinde koloni oluşturan birim), maya sayısı $2,4 \times 10^6$ kob/ml, küf sayısı 5×10^2 kob/ml, toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı 3×10^9 kob/ml, koliform sayısı $7,5 \times 10^2$ kob/ml, enterobakter sayısı 2×10^5 kob/ml, *E. coli* sayısı < 10 ve pH düzeyi 3,58 olarak ölçülmüştür.

Çalışmada termal nötral bölgede olan probiyotik uygulanmamış (Grup TNK) ve uygulanmış (Grup TNP) ile sıcaklık stresine maruz kalmış probiyotik uygulanmamış (Grup SSK) ve uygulanmış (Grup SSP) bıldırcınlara ait folikül (beyaz, sarımsı, sarı) sayıları, ortalama sarı folikül çapları, infundibulum, magnum ile isthmus uzunluk ve genişlikleri ve bu değerlerin gruplar arasındaki farkın istatistiki olarak anlamı Tablo 1'de detaylı bir şekilde verilmektedir. Gruplarda ölçülen değerlerin birbirleri ile ilişkinin korelasyonu da Tablo 2'de ayrıntılı bir şekilde sunulmaktadır.

Sunulan çalışmada ovaryum foliküler aktiviteye ait beyaz, sarımsı ve sarı folikül sayıları Grup TNK, TNP, SSK, SSP için sırasıyla; Beyaz foliküller için $15,6 \pm 1,89$; $20,2 \pm 2,03$; $14,67 \pm 2,19$; $14,22 \pm 1,54$. Sarımsı foliküller için $5,7 \pm 0,42$; $4 \pm 0,6$; $2,5 \pm 0,5$; $3,11 \pm 0,2$. Sarı folikül için $3,6 \pm 0,4$; $3,8 \pm 0,2$; $3 \pm 0,0$; $3,56 \pm 0,18$ olarak ölçülmüştür.

Tablo 1. Gruplar arasında ölçülen değerlerin (Ortalama±Standart Hata olarak) farkının karşılaştırılması

	GRUP TERMO NÖTRAL		GRUP SICAKLIK STRESİ		p
	KONTROL (TNK)	PROBİYOTİK (TNP)	KONTROL (SSK)	PROBİYOTİK (SSP)	
CA (g)	323,27±11,09 ^{***}	332,1±15,8 ^{a*}	250,37±13,41 ^b	335,83±19,99 ^{a*}	SSK-TNK=0,004 SSK-TNP=0,008 SSK-SSP=0,01
İN. U (mm)	26,19±3,03	29,67±3,88	12,48±1,1	27,55±2,06	
İN. G (mm)	3,26±0,38	4,83±0,5	5,5±0,99	4,43±0,42	
Mg. U (mm)	113,1±5,12	128,23±7,84	99,24±8,95	130,71±8,38	
Mg. G (mm)	7,26±0,56	7,79±0,54	7,4±0,4	7±6,2	
İs. U (mm)	90,72±5,51 ^a	69,96±6,76	106,9±10,06	66,2±3,29 ^b	TNK-SSP=0,007
İs. G (mm)	5,52±0,33	5,16±0,32	4,57±0,4	4,89±0,23	
TU (mm)	230,01±4,66	227,85±4,22	218,62±8,57	224,48±4,45	
OG (mm)	5,35±0,25	5,93±0,25	5,82±0,3	5,44±0,28	
BF	15,6±1,89	20,2±2,03	14,67±2,19	14,22±1,54	
SSF	5,7±0,42 ^a	4±0,6	2,5±0,5 ^{b***}	3,11±0,20 ^{b***}	TNK-SSK=0,000 TNK-SSP=0,001
SF	3,6±0,4	3,8±0,2 ^a	3±0,0 ^{b**}	3,56±0,18 ^{ac**}	SSK-TNP=0,001 SSK-SSP=0,002
OSFÇ (mm)	16,77±0,19 ^a	15,8±0,31	14,87±0,45 ^{b*}	15,45±0,2 ^{b*}	TNK-SSK=0,001 TNK-SSP=0,001

* P<0,05, **P<0,01, *** P<0,001. CA: Canlı Ağırlık, İN.: İfundibulum, Mg.: Magnum, İs.: İsthmus, U: Uzunluk, G: Genişlik, TU: Toplam Uzunluk, OG: Ortalama Genişlik, BF: Beyaz Folikül, SSF: Sarımsı Folikül, SF: Sarı Folikül, OSFÇ: Sarı Folikül Çaplarının Ortalaması.

Tablo 2. Ölçülen değerlerin korelasyonu.

		İN. U	İN. G	Mg. U	Mg. G	İs. U	İs. G	TU	OG	BF	SSF	SF	SFÇ
CA	PK	,321*	-,087	,266	,269	-,263	,234	,188	,212	,088	,323*	,485**	,303
	P	,044	,592	,097	,093	,101	,146	,245	,19	,588	,042	,002	,057
İN. U	PK	1	-,273	,196	,227	-,406**	,076	,319*	-,022	-0,004	,113	,166	,038
	P		,089	,227	,158	,009	,639	,045	,894	,981	,488	,305	,815
İN. G	PK		1	-,108	,128	,015	-,322*	-,299	,662**	,046	-,097	-,054	-,201
	P			,509	,43	,929	,043	,061	0	,777	,55	,739	,213
Mg. U	PK			1	-,141	-,746**	,450**	,415**	,039	,002	-,079	,222	,347*
	P				,385	0	,004	,008	,811	,991	,627	,169	,028
Mg. G	PK				1	-,024	-,056	-,083	,693**	-,123	,164	,387*	,044
	P					0,882	,73	,613	0	,45	,313	,014	,786
İs. U	PK					1	-,205	,162	-0,098	,128	,031	-,214	-,188
	P						,204	,318	,546	,43	,85	,185	,245
İs. G	PK						1	,367*	,187	,134	,13	,144	,276
	P							,02	,249	,409	,422	,374	,085

	İn. U	İn. G	Mg. U	Mg. G	İs. U	İs. G	TU	OG	BF	SSF	SF	SFÇ
TU	PK						1	-0,102	,185	,008	,1	,227
	P							,532	,254	,96	,538	,16
OG	PK							1	,018	,091	,268	,007
	P								,912	,577	,094	,966
BF	PK								1	,1	,223	-,04
	P									,54	,166	,806
SSF	PK									1	,330*	,422**
	P										,038	,007
SF	PK										1	,314*
	P											,049

CA: Canlı Ağırlık, İn.: İfundibulum, Mg.: Magnum, İs.: İsthmus, U: Uzunluk, G: Genişlik, TU: Toplam Uzunluk, OG: Ortalama Genişlik, BF: Beyaz Folikül, SSF: Sarımsı Folikül, SF: Sarı Folikül, SFÇ: Sarı Folikül Çaplarının Ortalaması, PK: Pearson korelasyonu, * Korelasyon 0,05 düzeyinde önemlidir. ** Korelasyon 0,01 düzeyinde önemlidir.

Tartışma ve Sonuç

Küresel ısınma ile artan sıcaklık stresinin kanatlı sektörü için olumsuz etkilerinin bildirildiği pek çok çalışma mevcuttur. Bu araştırmaların çoğu sıcaklık stresinin yem tüketiminde azalmaya ve canlı ağırlık kaybına (Arjona ve ark. 1988; Lott ve ark. 1992; Onderci ve ark. 2005; Habibian ve ark. 2016; Wasti ve ark. 2020) yol açtığını belirtmektedir. Çalışmamızda benzer şekilde sıcaklık stresine maruz bırakılan probiyotik uygulanmamış grupta (Grup SSK) diğer tüm gruplardaki bıldırcınlara göre canlı ağırlık kaybı gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak Batool ve ark. (2021)'nin düşündüğü gibi sıcaklık stresindeki bıldırcınlarda artan kan glukoz ve kolesterol seviyesinin glukoneogenezi uyarması ve ayrıca protein biyosentezindeki azalmadan dolayı vücut ağırlığında bir düşüş gerçekleştiği düşünülmüştür. Ek olarak sıcaklık stresinde neredeyse tüm türlerde azalan iştahın yansıması olarak da canlı ağırlık kaybının bir nedeni olabileceğinden şüphelenilmiştir. Sunulan çalışmada sıcaklık stresine maruz kalmalarına rağmen probiyotik amaçlı fermente laktik asit bakteri uyguladığımız bıldırcınlarda (Grup SSP) canlı ağırlık kaybı görülmemiştir. Bu bulgu Tekçe ve ark. (2020)'nin sıcaklık stresindeki bıldırcınlarda probiyotik amaçlı *Lactobacillus reuteri* uyguladıkları çalışmalarındaki 200 ve 400 mg/kg doz uyguladıkları gruplarındaki canlı ağırlık kazancı gözlemlemesi ile uyumaktadır. Fermente LAB'ın sıcaklık stresi altındaki bıldırcınlarda canlı ağırlık kaybını korumasının sebebi olarak Abdel-Moneim

ve ark. (2021)'nin açıkladığı gibi probiyotiklerin özellikle bağırsak sağlığı, epitel bütünlüğünü koruması ve mikroorganizma dengesi üzerine olumlu etkileri ve immun yanıt özelliklerinden kaynaklı olduğunu düşündürmüştür.

Sunulan çalışmada ovaryum foliküler aktiviteye ait beyaz, sarımsı ve sarı folikül sayıları göstermektedir ki genel anlamda ovaryum foliküler aktivitesi açısından en yüksek sayılar sıcaklık stresine maruz kalmamış ve probiyotik uygulanmış grupta ölçülmüştür. Kanatlı ovaryum foliküler dinamikte potansiyel yumurta olan hiyerarşik folikül (sarı folikül) sayılarına bakıldığında sıcaklık stresine maruz kalan bıldırcınlarda probiyotik uygulanan grupta ($3,56 \pm 0,18$) uygulanmayan kontrol grubuna göre ($3 \pm 0,0$) anlamlı bir şekilde artmıştır ($P=0,002$). İstatistiki olarak sıcaklık stresinde probiyotik uygulanan grupta, termo nötral aralıktaki probiyotik uygulanmayan hatta uygulanan bıldırcınlara ait sarı folikül sayıları arasında fark bulunmamıştır. Bu bulgu, kanatlılarda yem katkı maddesi olarak probiyotik kullanılan çalışmaların sonucunda artan yumurta veriminin bildirildiği araştırmalar (Zang ve ark. 2017; Kaya ve Dama 2018) ile paralellik göstermektedir. Ayrıca ilk defa değerlendirilen bıldırcın foliküler dinamik kapsamındaki bu bulgumuz kanatlılarda sıcaklık stresinin olumsuz etkilerinin probiyotik ile engellenebileceği görüşünü foliküler düzeyde de desteklemektedir.

Çalışmamızda termo nötral aralıktaki kontrol grubu bıldırcınların sarı folikül çaplarının ortalama-

sının sıcaklık stresine maruz bırakılan her iki gruba göre istatistiki olarak daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Bu verimiz de kanatlıların termo nötral bölgelerinde yumurta sayısının artmasına paralel yumurta boyutunun da büyüyeceğini düşündürmüştür.

Bıldırcınlarda ovidukt morfolojisi üzerine infundibulum, magnum ve isthmusun ayrı ayrı uzunluklarının ve anatomik orta nokta genişliğinin ilk kez ölçüldüğü sunulan çalışmada, bu kapsamda ölçülen bulgulara bakıldığında sıcaklık stresi altında ve probiyotik uygulanmayan bıldırcınlar hariç en uzun kısım magnum olarak ölçülmüştür. Bu ovidukt bölümlerinin ağırlıklarının ölçüldüğü Saleh ve ark. (2020)'nin araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Sıcaklık stresinde olup probiyotik uygulanmayan bıldırcınların magnumunun diğer gruplara göre daha kısa, paralelinde isthmusunun daha uzun ölçülmesinin sebebi olarak, bu grupta sarımsı ve sarı folikül sayısının diğer gruplara göre en az ölçülmesi, foliküler faaliyetlerin ovidukt üzerinde anatomik bir yansıması olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda ölçülen tüm verilerin birbirleri ile ilişkisini baktığımızda istatistiki olarak en güçlü ilişki magnum uzunluk ile isthmus uzunluğu arasında görülmüştür ($R = -0,746$). Ölçülen bu negatif ilişki diğer gruplardan farklı olarak magnumun en kısa ölçülürken isthmusun en uzun ölçüldüğü sıcaklık stresi kontrol grubumuzdaki verimiz ile tutarlılık göstermiştir. Ayrıca çalışmamızda sarımsı folikül ortalama çapları ile magnum uzunluğu arasında anlamlı pozitif bir ilişki ($R = 0,347$) gözlemlenmiştir. Bu korelasyon folikül çapının arttıkça magnumun uzadığının göstermektedir. Ölçülen bu sonuç, magnumları en kısa ölçülen bıldırcınların ($99,24 \pm 8,95$ mm) aynı zamanda folikül çap ortalaması en küçük ($14,87 \pm 0,45$ mm) ölçülen bıldırcınlar (Grup SSK) olmasını da göz önüne alarak bizde morfolojik açıdan oviduktun magnum bölümünün foliküler faaliyetlerden daha yoğun etkilendiği düşüncesini uyandırmıştır. Çalışmamızda sarı foliküllerin ortalama çapı ile sarımsı ve sarı folikül sayıları arasında bulduğumuz pozitif anlamlı korelasyon, bıldırcınlarda yumurta sayısının artacağı olumlu koşullarda (probiyotik uygulama, termal nötral bölge) yumurta büyüklüğünün de artacağı kanaati uyandırdı.

Sonuç olarak bıldırcınlarda ovidukt bölümlerinden magnum ve isthmus arasında güçlü bir negatif ilişki gözlemlenmiştir. Sıcaklık stresi altındaki bıldırcınlarda ovaryum folikül dinamiğine bakıldığında sarımsı folikül sayısının ve ortalama sarı folikül çaplarının küçüldüğü ölçülmüştür. Sıcaklık stresine maruz bırakılan bıldırcınlarda probiyotik etkili ferment

te laktik asit bakterilerin yem katkı maddesi olarak uygulanmasının sarı folikül sayısının azalmasını ve canlı ağırlık kaybını engellediği görülmüştür. Sıcaklık stresine maruz kalan kanatlılarda yumurta verimi düşüklüğünün bir sebebinin de foliküler gelişim üzerindeki olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu alanda yürütülecek olan daha kapsamlı ve moleküler çalışmalar ile sıcaklık stresinin kanatlılarda verim düşüklüğünün sebebinin ne olduğunu biraz daha aydınlatmaya ve dolayısıyla çözümünü için farklı fikirler üretmeye yardımcı olacağı kanaati oluşmuştur.

Kaynakça

- Abdel-Moneim AME, Shehata AM, Khidr RE, Paswan VK, Ibrahim NS, El-Ghoul AA, Aldhumri SA, Gabr SA, Mesalam NM, Elbaz AM, Elsayed MA, Wakwak MM, Ebeid TA. (2021) Nutritional manipulation to combat heat stress in poultry—A comprehensive review. *Journal of Thermal Biology*, 98, 102915. doi:10.1016/j.jtherbio.2021.102915
- Adanır S. (2019) Sıcaklık stresine maruz kalan Japon bıldırcınlarında probiyotik kullanımının büyüme gelişme ve bazı kan parametrelerine olan etkisi. Yüksek Lisans Tezi, BÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl.
- Akbalık ME, Saruhan BG, Topaloğlu U, Ketani MA. (2016) Kanatlılarda genital sistem histolojisi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 73-82.
- Alçay AÜ. (2019) İstanbul'da satılan pişmiş tavuk dönerlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 49(2), 74-85. doi:10.5222/TMCD.2019.074
- Anna H. (2021) Matrix Metalloproteinases (MMPs) and inhibitors of MMPs in the avian reproductive system: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8056. https://doi.org/10.3390/ijms22158056
- Arjona AA, Denbow DM, & Weaver Jr WD. (1988) Effect of heat stress early in life on mortality of broilers exposed to high environmental temperatures just prior to marketing. *Poultry science*, 67(2), 226-231. doi: 10.3382/ps.0670226
- Arslan A. (2012) Yoğun Yerleşim Sıklığında Beslenen Bıldırcınlarda Farklı Propolis Düzeylerinin Performans Karkas Yağ Asitleri ve Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, FÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Assersohn K, Brekke P, Hemmings N. (2021) Physiological factors influencing female fertility in birds. *Royal Society Open Science*, 8(7), 202274. doi: 10.1098/rsos.202274
- Aydın BD, Sezer Ç, Oral NB. (2008) Kars' ta satışa sunulan süzme balların kalite niteliklerinin araştırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 14(1), 89-94. doi:10.9775/kvfd.2008.12-A
- Bakst MR. (1998) Structure of the avian oviduct with emphasis on sperm storage in poultry. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 282(4-5), 618-626. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(199811/12)282:4/5<618::AID-JEZ11>3.0.CO;2-M
- Batool F, Bilal RM, Hassan FU, Nasir TA, Rafeeqe M, Elneer SS, Farag MR, Mahgoub HAM, Naiel MAE, Alagawany M. (2021) An updated review on behavior of domestic quail with reference to the negative effect of heat stress. *Animal Biotechnology*, 1-14. doi: 10.1080/10495398.2021.1951281

- Brooks JC, Martinez B, Stratton J, Bianchini A, Krokstrom R, Hutkins R. (2012) Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, 31(2), 154-158. doi: 10.1016/j.fm.2012.03.013
- Chao Y, Kim HW, Cramer T, Cheng HW, Kim YHB. (2018) Effect of probiotic feeding on oxidative stability and meat quality attributes of breast muscle from chickens exposed to chronic heat stress. *Meat and Muscle Biology*, 1(3). doi: 10.221751/rmc2017.161
- Cramer TA, Kim HW, Chao Y, Wang W, Cheng HW, Kim YHB. (2018) Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on meat quality characteristics of breast muscle from broilers exposed to chronic heat stress. *Poultry science*, 97(9), 3358-3368. doi: 10.3382/ps/pey176
- Cruvinel JM, Urayama PMG, Dos Santos TS, Denadai JC, Muro EM, Dornelas LC, & Pezzato AC. (2021) Different dietary electrolyte balance values on performance, egg, and bone quality of Japanese quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) under heat stress. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1), 1-8. doi: 10.1007/s11250-020-02472-7
- De Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AIM, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, 36(8), 2060-2076. doi: j.biotechadv.2018.09.003
- Dosoky WM, Zeweil HS, Ahmed MH, Zahran SM, Ali AM, Abdelsalam NR, Naiel MA. (2021) The influences of Tylosine and licorice dietary supplementation in terms of the productive performance, serum parameters, egg yolk lipid profile, antioxidant and immunity status of laying Japanese quail under heat stress condition. *Journal of Thermal Biology*, 99, 103015. doi: j.jtherbio.2021.103015
- Etches RJ, John TM, Gibbins AV. (2008) Behavioural, physiological, neuroendocrine and molecular responses to heat stress. *Poultry Production in Hot Climates*, Second edition. Ed. NJ Daghir. pp.31-66.
- Fathi MM, Ebeid TA, Al-Homidan I, Soliman NK, Abou-Emera OK. (2017) Influence of probiotic supplementation on immune response in broilers raised under hot climate. *British poultry science*, 58(5), 512-516. doi: 10.1080/00071668.2017.1332405
- Habibian M, Ghazi S, Moeini MM. (2016) Effects of dietary selenium and vitamin E on growth performance, meat yield, and selenium content and lipid oxidation of breast meat of broilers reared under heat stress. *Biological trace element research*, 169(1), 142-152. doi: 10.1007/s12011-015-0404-6
- Harrigan WF, McCance ME. (1976) *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* (No. QR 115. H37).
- Harrigan WF. (1998) *Laboratory Methods in Food Microbiology*. Third edition, Academic Press, San Diego, p.
- Hrabia A. (2021) Matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitors of MMPs in the avian reproductive system: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8056. doi: 10.3390/ijms22158056
- İnci H. (2019) Yumurtacı Bıldırcınlarda Sıcaklık Stresine Karşı Probiyotik Kullanımının Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(4), 887-892. doi: 10.30910/turkjans.633628
- Jahromi MF, Altaher YW, Shokryazdan P, Ebrahimi R, Ebrahimi M, Idrus Z, & Liang JB. (2016) Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, 60(7), 1099-1110. doi:10.1007/s00484-015-1103-x
- Johnson PA. (2012) Follicle selection in the avian ovary. *Reproduction in domestic animals*, 47, 283-287. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02087.x
- Kaya A, Dama G. (2018) Yumurtacı Tavuk Rasyonlarına Farklı Düzeylerde Propiyonik Asit İlavesinin Performans, Yumurta Kalitesi ve Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 129-134.
- Koyama H, Shi D, Fujimori T. (2019) Biophysics in oviduct: Planar cell polarity, cilia, epithelial fold and tube morphogenesis, egg dynamics. *Biophysics and physcobiology*, 16, 89-107. doi: 10.2142/biophysico.16.0_89
- Lott BD, Day EJ, Deaton JW, & May JD. (1992) The effect of temperature, dietary energy level, and corn particle size on broiler performance. *Poultry science*, 71(4), 618-624. doi:10.3382/ps.0710618
- Masuko T, Hariyama Y, Takahashi Y, Cao LM, Goto M, Ohshima M. (2002) Effect of addition of fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria prepared from timothy and orchardgrass on fermentation quality of silages. *Japanese Journal of Grassland Science*, 48(2), 120-125. doi: 10.14941/grass.48.120_1
- Mofidi MR, Yousef EM, Lotf EH, Bagherzadeh KF, Dehghani MR. (2021) Effect of Dietary Electrolyte Balance and Probiotic on Performance and Carcass Characteristics of Japanese Quails Under Heat Stress Conditions. *Research on Animal Production*, 11(30), p.20-30.
- Omraç H. (2021) Türkiye kanatlı eti üretiminde dünyada 10. Sırada. 24.11.2021. *Türk Tarım ve Orman e-dergi*. Erişim linki: <http://www.turktarim.gov.tr/Haber/702/turkiye-kanatli-etiuretiminde-dunyada-10--sirada>, Erişim tarihi: 23.03.2022.
- Onderci M, Sahin K, Sahin N, Cikim G, Vijaya J, Kucuk O. (2005) Effects of dietary combination of chromium and biotin on growth performance, carcass characteristics, and oxidative stress markers in heat-distressed Japanese quail. *Biological Trace Element Research*, 106(2), 165-176.
- Orhan C, Sahin N, Sahin K, Kucuk O. (2021) Influence of dietary genistein and polyunsaturated fatty acids on lipid peroxidation and fatty acid composition of meat in quail exposed to heat stress. *Tropical Animal Health and Production*, 53(5), 1-11. doi:10.1007/s11250-021-02933-7
- Saleh AA, Eltantawy MS, Gawish EM, Younis HH, Amber KA, El-Moneim A, Ebeid TA. (2020) Impact of dietary organic mineral supplementation on reproductive performance, egg quality characteristics, lipid oxidation, ovarian follicular development, and immune response in laying hens under high ambient temperature. *Biological trace element research*, 195(2), 506-514. doi: 10.1007/s12011-019-01861-w.
- Sen S, Ingale SL, Kim YW, Kim JS, Kim KH, Lohakare JD, & Chae BJ. (2012) Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 264-268. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.05.021
- Sert S, & Kıvanç M. (1985) Taze civit ve lor peynirleri üzerinde mikrobiyolojik çalışmalar. *Gıda*, 10(5), 287-292.
- Song J, Xiao K, Ke YL, Jiao LF, Hu CH, Diao QY, & Zou XT. (2014) Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry science*, 93(3), 581-588. doi: 10.3382/ps.2013-03455
- Şentürk MG, Uyanık F. (2016) Yumurtacı Bıldırcınlarda Oluşturulan Isı Stresinde Krom ve Çinkonun Bazı Kan Parametrelerine Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13(1), 38-49.

- Tekçe E, Bayraktar B, Aksakal V, Dertli E, Kamiloglu A, Topcu KC, Yasulergezer N. (2020) Influence of *Lactobacillus reuteri* on internal organ weight, performance and meat quality of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) under heat stress. *European Poultry Science*. doi: 10.1399/eps.2020.304
- Tonbak F. (2012) Sıcaklık Stresine Maruz Bırakılan Bıldırcınlarda Rasyona İlave Edilen Tarçın Yağının Performans ve Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkileri. (Yüksek Lisans Tezi, FÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ)
- Türkiye İstatistik Kurumu. (2021) *Hayvansal Üretim İstatistikleri*. Erişim linki: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2021-45593> , Erişim tarihi: 26.03.2022.
- Wasti S, Sah N, Mishra B. (2020) Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals*, 10(8), 1266. doi: 10.3390/ani10081266
- Zhang P, Yan T, Wang X, Kuang S, Xiao Y, Lu W, Bi D. (2017) Probiotic mixture ameliorates heat stress of laying hens by enhancing intestinal barrier function and improving gut microbiota. *Italian Journal of Animal Science*, 16(2), 292-300. doi:10.1080/1828051X.2016.1264261
- Zhang ZY, Jia GQ, Zuo JJ, Zhang Y, Lei J, Ren L, Feng DY. (2012) Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. *Poultry science*, 91(11), 2931-2937. doi: 0.3382/ps.2012-02255



Pathomorphological and immunohistochemical evaluation of chronic (isolated) organ tuberculosis in a cow

Yavuz Ulusoy^{1*}, Bahadır Kılınc², Halil Pir³, Funda Terzi⁴, Orhan Dudaklı⁵

^{1,2,3,5} Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Türkiye

⁴ Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kastamonu, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 14.09.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 11.04.2022

Abstract: In this study, it was aimed to present a case of chronic organ tuberculosis in a cattle pathomorphologically and immunohistochemically. General findings of chronic isolated organ tuberculosis in cattle in the late period were presented in this report. The 2-year-old cattle died as a result of respiratory distress and was brought to the pathology laboratory to determine the cause of death. In necropsy, it was detected that encapsulated caseous foci localized in the caudal lobe of the right lung and mediastinal lymph nodes were inactive. Histopathologically, secondary caseous necrosis, mineralized, peripheral mononuclear cell infiltration, and fibrous capsule were detected. Immunohistologically, macrophages and neutrophils were found to be positive for *Mycobacterium bovis*. However, regional lymph nodes were negative. Also, there was no histopathological reaction in other parenchymatous organs. As a result, the postprimary form of tuberculosis is not always detectable when compared to other forms. Therefore, we believe that this case report may be useful.

Keywords: Cow, post-primary tuberculosis, immunohistochemical diagnose, pathomorphology.

İneklerde kronik (izole) organ tüberkülozunun patomorfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi

Özet: Bu çalışmada bir sığırda kronik organ tüberkülozu vakasının patomorfolojik ve immünohistokimyasal olarak sunulması amaçlandı. Bu raporda geç dönemde bir sığırda gelişen kronik, izole organ tüberkülozuna ait genel bulgular sunuldu. Solunum sıkıntısı sonucu yaşamını yitiren 2 yaşındaki sığır, ölüm nedeninin belirlenmesi için patoloji laboratuvarına getirildi. Nekropside, sağ akciğerin kaudal lobunda lokalize kapsüllenmiş kazeöz odaklar ile mediastinal lenf düğümlerinin inaktif olduğu tespit edildi. Histopatolojik olarak sekonder kazeöz nekroz, mineralize, periferon mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibröz kapsül tespit edildi. İmmünohistolojik olarak, makrofajlar ve nötrofillerin *Mycobacterium bovis* açısından pozitif olduğu görüldü. Ancak bölgesel lenf düğümleri negatifti. Ayrıca, diğer parankimatöz organlarda histopatolojik reaksiyon yoktu. Sonuç olarak, postprimer tüberküloz formu, diğer formlarla karşılaştırıldığında her zaman tespit edilememektedir. Bu nedenle, bu olgu raporunun yararlı olabileceğine inanıyoruz.

Anahtar kelimeler: İnek, post-primer tüberkülozu, immünohistokimyasal tanı, patomorfoloji.

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a contagious bacterial disease in cattle. The infection can affect a variety of animals, and also humans. The etiologic agent is *Mycobacterium bovis* (O'Reilly Daborn. 1995). Transmission is by droplet infection, sputum, feces, inhalation of dust contaminated with the urine of infected animals (Jemal. 2016; Neill et al. 2001). At this point, innate immunity plays an important role to avoid its spread to other organs through hematogenous and lymphomatous routes, and also by respiratory channels (Arentz Hawn. 2007). Due to the large amount of lipid entering the cell wall of the tubercle bacillus,

it resists phagocytosis and multiplies in macrophages. The initial reaction against mycobacteria occurs in the cells of the interalveolar septum and triggers the inflammatory reaction via signaling pathways after phagocytosis by macrophages and neutrophils (Domingo et al. 2014). Accumulated mycobacterial agents stimulate the inflammatory response and cell-mediated hypersensitivity (Admassu et al. 2015). It leads to the production of two main mediators of the immune response, NO and TNF- α , in activated macrophages. Antigens derived from *M. bovis* can also activate bovine $\gamma\delta$ T cells in vitro (Askar et al. 2021). In addition, $\gamma\delta$ T cells play an important role

Yazışma adresi / Correspondence: Yavuz Ulusoy, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No:21 Keçiören Ankara, Türkiye
e-mail: yavuz.ulusoy@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-6942-5013 • ²0000-0003-3426-2116 • ³0000-0001-9078-3122
⁴0000-0002-6184-5408 • ⁵0000-0001-9598-8055

both in the early stages of *M. bovis* infection and in lesion formation (Cassidy et al. 2001). Mycobacterial factors enable CD4+ T cells to differentiate into Th1 cells (Hunter. 2020). CD4+ T cells attempt to arrest intracellular mycobacterial growth, while CD8 T cells lyse *M. bovis*-infected macrophages (Skinner et al. 2003). In addition, activated T cells, cytokine, and chemokine signals at the site of infection attract and activate monocytes and macrophages, and granulomas form as cells accumulate (Palmer et al. 2021). Granulomas are pathognomonic lesions of tuberculosis (Carrisoza-Urbina et al. 2019). The typical tuberculoid granuloma microscopic structure is surrounded by a central region with caseous necrosis, epithelioid macrophages, and a region of multinucleated giant cells, the outermost region containing an increased number of lymphocytes and rarely plasma cells (Carrisoza-Urbina et al. 2019; Palmer et al. 2021). As the infection persists, it may be surrounded by a partial or complete fibrous capsule (Palmer et al. 2021).

The tubercle is usually about 2-20 mm in diameter and whitish to yellowish in color and is more or less encapsulated by connective tissue and often contains central caseous necrosis and mineralization (Admassu et al. 2015; Domingo et al. 2014; Neill et al. 2001). Tuberculosis lesions are usually found in the bronchial and/or mediastinal lymph nodes and are generally thought to be the first to be affected (Stamp. 1948). In the lung, it is characterized by extension along the bronchiole and bronchial tree with multifocal confluent caseous necrosis in chronic organ tuberculosis (Domingo et al. 2014). Ulcerative lesions can be seen in the bronchi and trachea.

In this case, we have shown some specific lesions developed against *Mycobacterium bovis* in chronic organ tuberculosis, which is a type of post-primary tuberculosis.

Case History

The material of the case was provided from lung specimens obtained in the autopsy of a 2-year-old cow. First of all, tissue specimens were taken from all lesions localized in the caudal lobe of the right lung. They were fixed at 10% neutral buffered formalin (NBF) solution for 48 hours. The specimens were trimmed and processed in automatic tissue processor (Leica ASP300S). The tissues were solidified in degraded alcohol series, xylol and paraffin wax. After being embedded in paraffin (Shandon

Histocentre2), blocks were serially trimmed at 4 µm thickness. Glass slides were stained with routine hematoxylin-eosin (H&E) and coverslips were mounted using Entellan® mounting medium.

Sections taken on poly-lysine slides were passed through xylol and alcohol series. Peroxidase immunostaining was performed according to the Novocastra, RE7120-K (Leica, United Kingdom) kit procedure to detect the antigen in the tissue. As the primary antibody, monoclonal anti *Mycobacterium bovis* (1/1000 dilution, *M. bovis*, VMRD, 280-5, USA) was used. Proteinase K (ab64220) was dripped onto paraffin block sections and then incubated in 3% H₂O₂ peroxidase block solution. Then, the protein block solution was poured. The sections 1:1000 anti-*M. bovis* were dropped and left at room temperature for 1 hour. After the primary antibody, Biotinylated Secondary Antibody was dripped and kept at room temperature for 30 minutes. Sections were dripped with Streptavidin-HRP and incubated for 30 minutes. Diaminobenzidine (DAB) was used to show antigen-antibody complex and Hematoxylin was used to counterstain. After dehydrated alcohol series and xylols, the glass slides were covered with coverslip by using Entellan® mounting medium.

The owner stated it showed a number of symptoms in the period of terminal illness such as respiratory distress. In autopsy, caseous lesions had spherical shape and reached 1 to 3 cm in diameter in right lobe of the lung (Fig 1a). After histopathology examination, it was confirmed that other lobes and regional lymph nodes were not affected by the lesions (Fig 1b). Other organs were intact. However, primary and secondary caseous necrosis as well as predominant mononuclear cell infiltration including predominantly macrophage, lymphocyte and less epithelioid histiocytes, multinucleated Langhans giant cell, plasma cell as well as neutrophil leucocytes were observed by collecting in foci of lung (Fig 1 a-d). In addition, encapsulation and mineralization were not observed in some lesions.

Immunohistochemistry showed a positive reaction in the cytoplasm of macrophages (Fig 2e) and in the cytoplasm of cells (Fig 2f). The microbial agent were present immunopositively in such areas. However, positive reactions were observed in interalveolar septum cells in some regions (Fig 2g). In contrast to be founded positivity in lung, mediastinal lymph nodes did not react with the specific antibody of *M.bovis*.

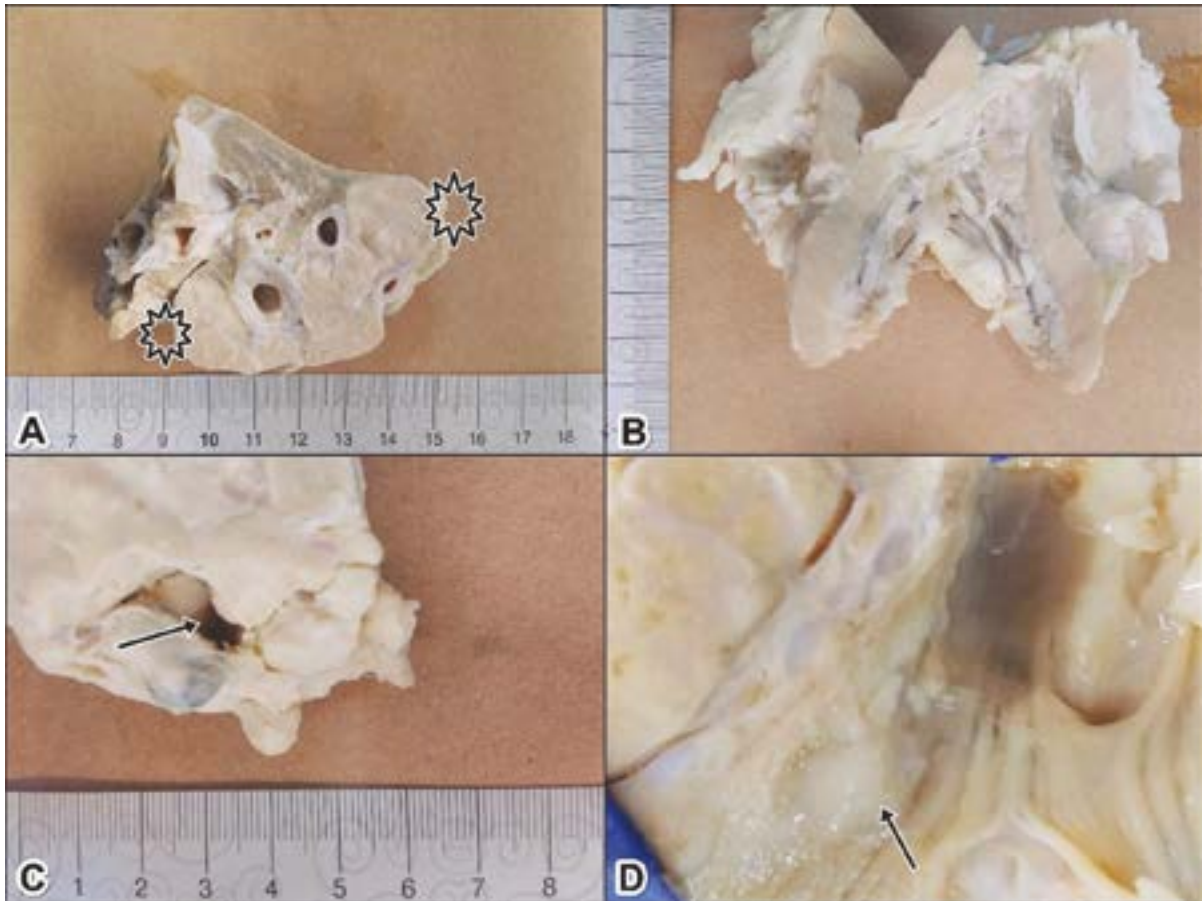


Figure 1. Macroscopic appearance of isolated organ tuberculosis. **A.** Acinar foci (stars) general view of lesions at cut section in right lung. **B.** General view of the lung mediastinal lymph node **C.** No lesion in lymph node (black arrow) **D.** Ulcerated mucosa of bronche (black arrow).

Previous reports have shown that 63% to 73% of lesions were found in the lung or existed both in lungs and mediastinal lymph nodes. These foci were under 1 cm in diameter (McIlroy et al. 1986; Neill et al. 1988). In our case, the foci were located solely in a lobe of right lung. The mean size of those was almost 1 to 3 cm. It shows us that the lesions may occasionally extend into extraordinary size.

On the other hand, histological presentation of lesions may vary with different cellular architectures in bovine Tuberculosis (bTB). In consequence, Wangoo et al. (2005) have reported granulomatous reaction in four types of granulomas from type I to type IV. For type I granulomas, although there is no necrosis, it is experienced in the initial stage, and shows epithelioid macrophages, multinucleated Langhans-type cells and lymphocytes at the periphery of the lesion. In some instances, neutrophil infiltrations are located at the center. For type II granulomas, aforementioned appearance is still present; but the-

re is also ample amount of central caseous necrosis and peripheral lymphocytes. However, in type III, mineralisation is also added to cellular architecture in addition to a similar appearance. Type IV granulomas contain lymph node lesions that are composed of caseous necrosis with mineralisation, classic cellular architecture and extensive fibrous capsule. In our case, the lesions in the lung mostly belonged to type II and III. It was detected around necrotic foci, in the bronchial, bronchiolar and alveolar epithelium, in the exudate and in the cytoplasm of neutrophils, alveolar macrophages. In previous studies (Adegboye et al. 1995; Radaelli et al. 2008; Yilmaz et al. 2014), it was detected around necrotic foci, in the bronchial, bronchiolar and alveolar epithelium, in the exudate and in the cytoplasm of neutrophils, alveolar macrophages. Similar to the previous study, *M.bovis* antigen was detected in the cytoplasm of interalveolar septum cells, neutrophils and alveolar macrophages.

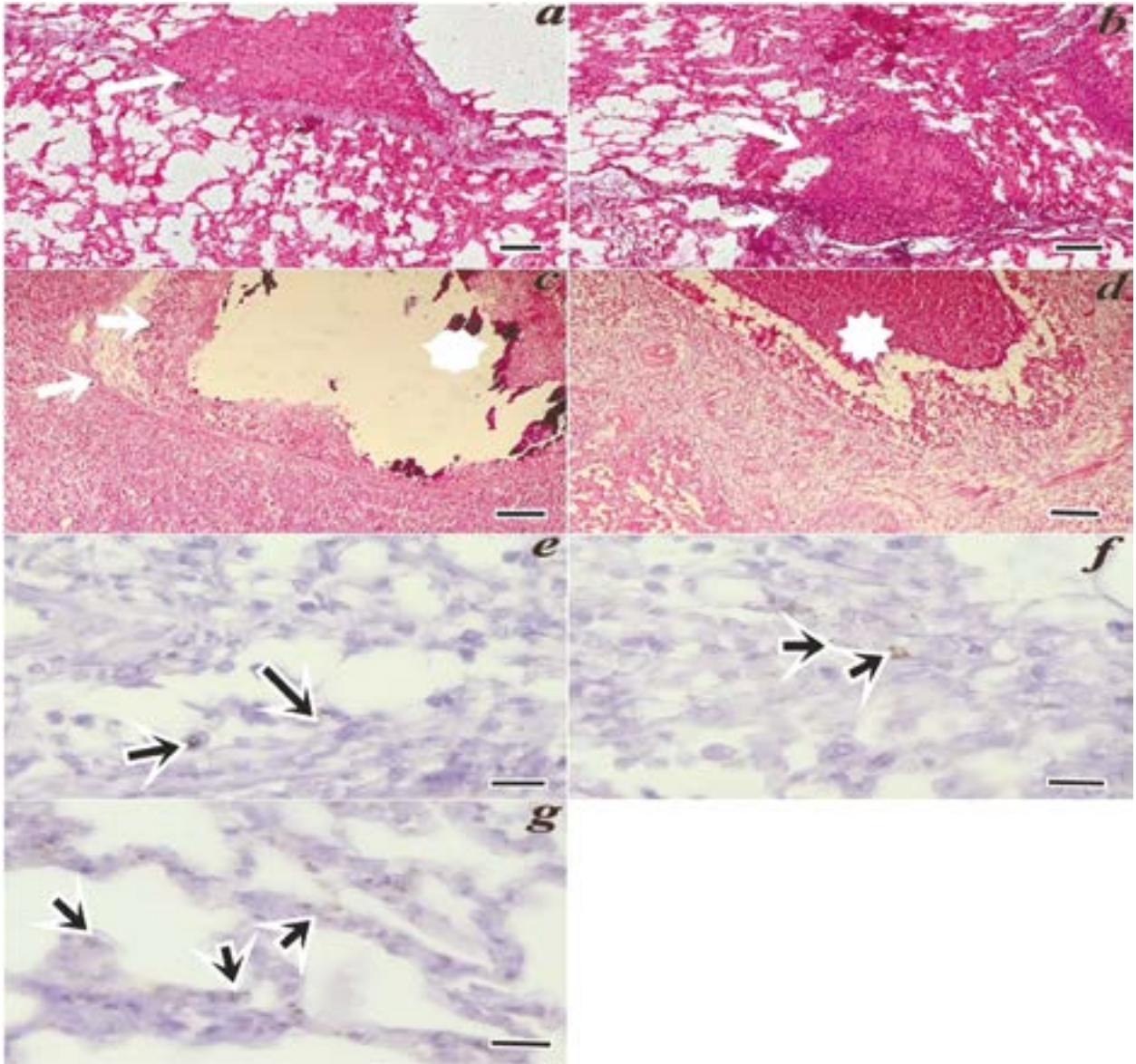


Figure 2. Histopathological and immunohistochemical findings. **a.** Histopathological appearance of primary caseous necrosis (arrow). Bar: 250 μ m. H &E. **b.** Caseous necrosis (white arrow) and fibrous encapsulation. Bar: 250 μ m. H&E. **c.** Mineralization (asterisk), macrophage, lymphocyte, Langhans giant cell, epithelioid histiocytes (arrow) and fibrous encapsulation (white arrow). Bar: 250 μ m. H&E. **d.** Caseous necrosis opening into the bronchiole (asterisk). Bar: 250 μ m. H&E. **e-f.** *M. bovis* positive staining in the cytoplasm of macrophages (black arrows) and in the cytoplasm of cell (black arrows). Bar :150 μ m. ABC-P. **g.** In interalveolar septum cells *M.bovis* positive staining (black arrows). Bar :150 μ m. ABC-P.

This inflammatory progression may be associated with microbial burden. For this situation, Phillips et al. (2003) have reported that 10^3 – 10^5 Colony Forming Unit (CFU) might trigger natural bTB, resulting in the initial lesions of disease. However, in another study, it was demonstrated that intranasal administration of 92 CFU of *M. bovis* did not lead to lesion

formation (Neill et al. 1988). Buddle et al. (1994) and Buddle et al. (1995) have reported that intratracheal inoculation of 500–800 CFU of *M. bovis* culminated in small lesions in the lungs and regional lymph nodes. For the generalization of such lesions, it was suggested that 5×10^5 CFU or higher may be effective. In this natural case, we have considered that ba-

cterial load of *M. bovis* infection could be lower than 10^5 CFU since we did not observe any generalization into regional lymph nodes and other organs.

In the result, the lesions in this case pertained to chronic or isolated organ tuberculosis. The tubercles were often in middle stage of progression. Hence, we did not believe there was any immunosuppression or re/super-infection that may change the microorganism burden in tissue environment. Therefore, no lymph nodes were affected in this post-primary stage of bTB.

References

- Adegboye DS, Rasberry U, Halbur PG, Andrews JJ, Rosenbusch RF. (1995). Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded calf lung tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(2), 261-265.
- Admassu B, Kebede E, Shite A. (2015). Review on bovine tuberculosis. *Eur J Biol Sci*, 7(4), 169-185.
- Arentz M, Hawn TR. (2007). Tuberculosis infection: insight from immunogenomics. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(4), 231-236.
- Askar H, Chen S, Hao H, Yan X, Ma L, Liu Y, Chu Y. (2021). Immune Evasion of *Mycoplasma bovis*. *Pathogens*, 10(3), 297.
- Buddle B, Aldwell F, Pfeffer A, Lisle Gd, Corner L. (1994). Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *New Zealand Veterinary Journal*, 42(5), 167-172.
- Buddle B, De Lisle G, Pfeffer A, Aldwell F. (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*, 13(12), 1123-1130.
- Carrisoza-Urbina J, Morales-Salinas E, Bedolla-Alva MA, Hernández-Pando R, Gutiérrez-Pabello JA. (2019). Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. *PLoS one*, 14(7), e0218547.
- Cassidy J, Bryson D, Cancela MG, Forster F, Pollock J, Neill S. (2001). Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *Journal of comparative pathology*, 124(1), 46-51.
- Domingo M, Vidal E, Marco A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 97, S20-S29.
- Hunter RL. (2020). The Pathogenesis of Tuberculosis–The Koch Phenomenon Reinstated. *Pathogens*, 9(10), 813.
- Jemal AM. (2016). Review on zoonotic importance of bovine tuberculosis and its control. *Open Access Library Journal*, 3(3), 1-13.
- McIlroy S, Neill S, McCracken R. (1986). Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *The Veterinary Record*, 118(26), 718-721.
- Neill S, Bryson D, Pollock J. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81(1-2), 79-86.
- Neill S, Hanna J, O'brien J, McCracken R. (1988). Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *The Veterinary Record*, 123(13), 340-343.
- O'Reilly LM, Daborn C. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung disease*, 76, 1-46.
- Palmer MV, Thacker TC, Kanipe C, Boggiatto PM. (2021). Heterogeneity of pulmonary granulomas in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
- Phillips C, Foster C, Morris P, Teverson R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in veterinary science*, 74(1), 1-15.
- Radaelli E, Luini M, Loria G, Nicholas R, Scanziani E. (2008). Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Research in veterinary science*, 85(2), 282-290.
- Skinner MA, Buddle BM, Wedlock DN, Keen D, de Lisle GW, Tascon RE, Candido Ferraz J, Lowrie DB, Cockle PJ, Vordermeier HM. (2003). A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infection and immunity*, 71(9), 4901-4907.
- Stamp J. (1948). Bovine pulmonary tuberculosis. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 58, 9-IN3.
- Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackbar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M. (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, $\gamma\delta$ (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of comparative pathology*, 133(4), 223-234.
- Yılmaz R, Özyıldız Z, Yumuşak N. (2014). Koyunlarda coenurus cerebri'si' in patomorfolojik bulguları. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(2), 73-77.



DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines and strategies

Aseña Esra Erdem^{1*}, Barış Sareyyüpoğlu²

^{1,2} Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 05.05.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 11.04.2022

Abstract: In veterinary medicine, vaccination is one of the most effective techniques for control and prevention of diseases. When other methods fail in control of animal diseases, different vaccines and strategies are developed. DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines lacking one or more antigenic epitope(s)/ protein(s) in the prevailing field strain and the accompanying diagnostic tests are effective in eradication and control of diseases. While currently used vaccines can not distinguish between vaccinated and infected animals, DIVA vaccines can be very useful for the purpose. Serological tests, such as ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), used together with DIVA vaccines, can be used to determine which animals are infected and which are vaccinated. DIVA vaccines and strategies for some animal diseases have been developed and continue to be developed.

In this review, it is aimed to explain the general characteristics, importance, production, advantages of DIVA vaccines and strategies and their use in various animal diseases.

Keywords: DIVA, marker vaccines, vaccine, veterinary medicine.

DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) aşısı ve stratejileri

Özet: Veteriner hekimlik alanında aşılama, hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde en etkili yöntemlerden birisidir. Hayvan hastalıklarının kontrolünde mevcut yöntemler başarısız olduğunda, farklı aşısı ve stratejiler geliştirilmektedir. Saha suşunda yer alan bir veya daha fazla antijenik epitop veya proteinden yoksun olan DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) aşısı ve beraberinde kullanılan tanı testleri, hastalıkların eradikasyonu ve kontrolünde oldukça etkilidir. Mevcut aşılar, aşı ve enfekte hayvanların ayrımını sağlayamazken, DIVA aşısı bu alanda önemli yararlar sağlar. Bunun yanında ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) gibi DIVA aşısıyla birlikte kullanılan serolojik testler, hangi hayvanların enfekte ve hangilerinin aşı olduğunu ayırmak için kullanılabilir. Bazı hayvan hastalıklarına yönelik DIVA aşısı ve stratejileri geliştirilmiş ve diğerleri için de geliştirilmeye devam edilmektedir.

Bu derlemede, DIVA aşısı ve stratejilerinin genel özelliklerini, önemini, üretimini, avantajlarını ve bunların çeşitli hayvan hastalıklarında kullanımını açıklamak amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: aşısı, DIVA, marker aşısı, veteriner hekimlik.

Introduction

Vaccines are biological substances prepared either by using the agents or their antigenic molecules in order to protect living organisms against pathogenic microorganisms (Arda 2011). Edward Jenner initially used the "vaccine" term from the "vacca" Latin for cow and "vaccinia" Latin for cowpox to explain the protection of humans against smallpox virus. In order to provide this protection, people were inoculated with cowpox vaccine (Meeusen et al. 2007). Vaccination is one of the most important medical developments to date and many researchers played a significant role in the development of vaccines (Sareyyüpoğlu and İzgür 1999; Morgan and Parker 2007). Vaccines can be used both to control, pre-

vent, eliminate and eradicate diseases at the population and the weakening of clinical signs in infection (Meeusen et al. 2007).

Exposure to a live pathogen followed by recovery is a way of immunization (Owen et al. 2013). The aim of the vaccination strategy is to generate a naturally acquired immunity by inoculation of a particular pathogen, or its immunojenic but non-pathogenic components (Meeusen et al. 2007). These components stimulate antigen-specific lymphocytes and allow the formation of memory cells. Vaccination is an event, whereas immunization is a potential consequence of this event (Owen et al. 2013).

Vaccination is widely used in veterinary medicine as the cost-effective intervention tool for the control and prevention of diseases. It also plays a vital role in global eradication programs (Baron et al. 2018). The primary purpose of vaccines in veterinary medicine is to improve the welfare and health condition of domestic animals and to prevent disease spread from both domestic and wild animals to humans. These different aims have led to various veterinary vaccine approaches (Meeusen et al. 2007).

Due to antibodies formed in serum after vaccination, it is difficult to distinguish between antibody titers resulting from conventional vaccination and exposure to the actual agent. To make this distinction possible, marker vaccines and/or DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines have been developed (Day and Schultz 2014).

General Information About DIVA Vaccines

The DIVA principle is based on the fact that antibody response against the causative agent antigens involved in DIVA vaccines is different from the antibody response to the actual microorganism in the

field (Uttenthal et al. 2010). While DIVA vaccines do not contain one or more immunological protein or antigen, very same substances are naturally present in the field strain (Guo et al. 2017). Moreover, these vaccines provides an opportunity for serological differentiation between the vaccinated and the infected individuals. A marker / DIVA vaccines are used with accompanying tests. These tests identify antibodies against a protein not found in the vaccine strain (Van Oirschot et al. 1996). These vaccines can be deletion mutants of field pathogens or subunit / peptide vaccines (Francis 2017). Development of the DIVA vaccines also requires the development of an accompanying diagnostic test (Day and Schultz 2014). ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) is generally used to test the efficiencies of a vaccination (Akan et al. 2006; Arda 2011; Dhama et al. 2016). As a result, these serologic tests can detect antibody response to specific protein(s) after infection (Van Oirschot et al. 1996). Current vaccines often do not provide differentiating between vaccinated and infected animals, while DIVA vaccines differentiate those vaccinated from the infected ones (Selke et al. 2007; Holzer et al. 2016).

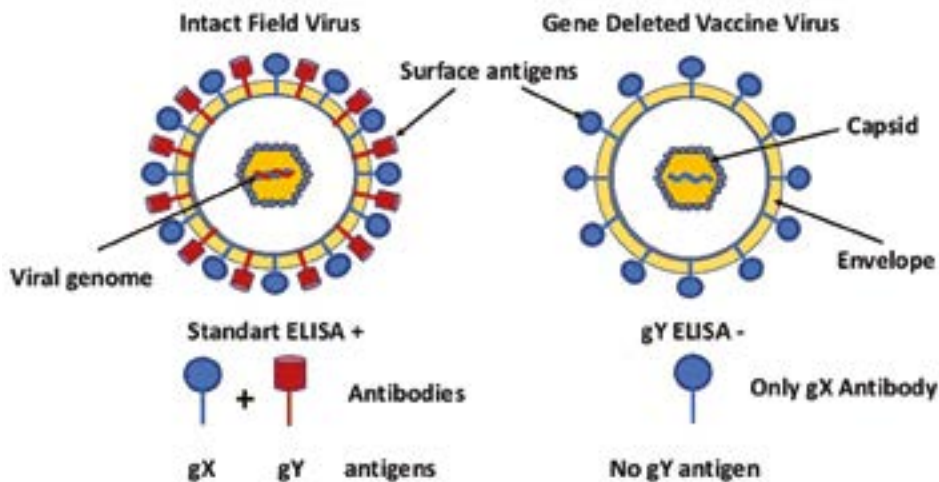


Figure 1. Use of ELISA in DIVA vaccines.

When creating DIVA vaccines, this is significant to detect which points are essential for the eradication or control of certain diseases. Each vaccine technology has benefits that can be used to develop the vaccine with desired properties; Thus, vaccines and accompanying diagnostic tests will have a significant effect on the eradication or control. As marker vaccines; by the help of the conventional technologies, subunit vaccines, DNA vaccines, live vector vaccines and deletion mutants have been developed. For the development of diagnostic tests;

conventional methods (ELISA, neutralization tests, etc.), western blot technology, nucleic acid (PCR, real-time PCR) and biosensor technologies have been developed (Henderson 2005; Dhama et al. 2016).

The ideal marker (DIVA) vaccine should include: no long-term or short term side effects, provide genetic stability in the targeted species, should be durable, should be easy to produce and the cost of production should be low, act early and provide lifelong immunity, should be easily detectable in the body, should be effective against all virus vari-

ants, the antigenic components they carry should have good immunogenicity, should protect the host from horizontal and vertical transmission, should not have cross reactions, should permit subsequent vaccinations, should have a specific DIVA differential test (Arda 2011; Blome et al. 2017b). DIVA vaccines and accompanying diagnostic tests must meet established licensing necessities for efficacy, safety and purity, and the sensitivity and specificity of the diagnostic test should be high (Henderson 2005).

The various advantages of these vaccines are: they can differentiate vaccinated animals from infected ones, they do not reproduce, spread in/out of the body, and free of complete microorganisms and their nucleic acids (except mutant strains), they are easily tolerated, prevalence and incidence of infection in vaccinated populations can be studied under the field conditions, their efficacies can be measured well. Thus they can be applied in vaccination eradication programs (Van Oirschot et al. 1996; Arda 2011).

Development of DIVA Vaccines

Despite the regulations on imports of animal and animal products, the risk of emergence of animal diseases still continues in some countries. Particularly in areas with crowded animal populations, eradication efforts based on quarantine measures may be insufficient in preventing diseases. These conditions, combined with increasing economic and ethical concerns, have provoked the development of different vaccines and strategies to control outbreaks (Pasick 2004).

Vaccine efficacy in a population is a function of the ability of the vaccine to decrease the virus contamination. If the antibody response to the vaccine antigens is indistinguishable from the infection, it may complicate serological follow-up studies and subsequent eradication strategies. Thanks to the DIVA vaccines and the accompanying diagnostic tests, this disadvantage can be easily overcome (Pasick 2004).

The first licensed DIVA vaccine was produced to identify wild type pseudorabies virus with the ELISA kit that blocks protein A (Liu et al. 2013). The term "DIVA" was initially offered by J. T. van Oirschot in the Netherlands in 1999. This term is used as an abbreviation for 'Differentiation of Infected from Vaccinated Animals' (Pasick 2004). DIVA vaccines are originally deletion mutants of wild microorganism strains (Uttenthal et al. 2010). Diagnostic tests should be used with these vaccines to identify an-

tibodies formed against epitopes (Ganguly et al. 2015). DIVA vaccines are generally based upon the lack of minimum one immunogenic protein in the vaccine strain. In the DIVA strategy, after vaccination with DIVA vaccines, diagnostic tests are used to determine antibodies against antigens that are not in the vaccine strain (Liu et al. 2013). This system makes it possible to mass vaccinate as well as to allow serological follow-up of a sensitive animal population for effective disease control (Pasick 2004).

Use of DIVA Strategy Against Some of the Significant Diseases in Veterinary Medicine

DIVA strategies are being developed for the control of significant diseases such as bovine rhinotracheitis, avian influenza, pseudorabies, bovine tuberculosis, classical swine fever and PPR in veterinary medicine (Dhama et al. 2016; Singh 2021).

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)

DIVA vaccines containing the glycoprotein E (gE) deleted strain of BoHV-1 (Bovine Herpesvirus) the agent of IBR, has been reported to be an effective and safe strategy to IBR, which can be effectively used in countries with high prevalence of diseases (Muratore et al. 2017). Accordingly, the IBR marker vaccine contains a genetically modified virus that does not produce glycoprotein E. A suitable serological test (ELISA) is developed to be used with the vaccine. A vaccinated cow with serum antibody against glycoprotein E is interpreted as being exposed to the field virus (Arda and Sareyyüpoğlu 2004; Day and Schultz 2014; Petrini et al. 2020).

Avian Influenza (AI)

One deficiency of inactivated vaccines is the difficulty of controlling avian influenza virus (the agent of avian influenza) because it cannot distinguish between vaccinated and naturally infected poultry by serologically widely used methods. Until recently, some DIVA strategies have been developed for avian influenza (AI) (Suarez 2005). Current research results show that the DIVA control strategy can be a tool for the control of AI infections (Capua et al. 2003; Sun et al. 2021). These strategies include observation, subunit vaccine use (have included just hemagglutinin), non-structural protein 1 (NS1) strategies (this protein is produced in infected cells, so naturally infected poultry can develop antibodies to the NS1), and heterologous neuraminidase strategy (Suarez 2005). The heterologous neuraminidase strategy is based upon the use of an inactivated oil emulsion vaccine including the same hemaggluti-

nin (HA) subtype but different neuraminidase (NA) subtype. (Capua et al. 2003). Vaccinated poultry will be protected on the basis of HA antibodies, but if the poultry are infected with the virus that causes the outbreak, different NA antibodies will be produced which can be separated from the NA antibodies produced after the use of the vaccine (Lee et al. 2004). For example, if the wild strain is H7N2, the animals can be vaccinated with H7N3 or the remaining seven appropriate combinations. Serological monitoring against N3 protein confirms that the flock is vaccinated, whereas, serological monitoring against N2 protein can be observed with wild type strain. That is, it can be determined that the animals are vaccinated or infected. Commercially, this strategy was first implemented in 2010, when the H7N1 outbreak occurred in Italy, by vaccinating with the H7N3 vaccine (Suarez 2005).

Pseudorabies (Aujeszky's Disease)

The DIVA strategy for control of pseudorabies has been used successfully in many countries (Freuling et al. 2017). With the deletion of the gE gene, it is aimed to enable the DIVA approach for the control of this disease (Meeusen et al. 2007). Pseudorabies are the main examples of DIVA in combination with ELISA (Freuling et al. 2017). Thanks to the ELISA, it can distinguish between animals producing antibodies against gE after wild type virus infection and animals those do not have antibodies against gE after vaccination, though they can carry antibodies against other PrV (Pseudorabies virus) glycoproteins (Freuling et al. 2017; Mettenleiter 2020). In prV eradication, gB / gE ELISA showed high specificity and sensitivity; could determine antibody from serum, blood and colostrum. Recently, high-precision techniques have been developed to differentiate vaccine virus genetic material from the wild strain genome (Freuling et al. 2017).

Classical Swine Fever

Classical swine fever virus (CSFV) is an RNA virus from Pestivirus genus (Dong and Chen 2007; Blome et al. 2017a). The glycoprotein E2 in the envelope is the most important immunogen of pestiviruses. Antibodies of E2 and antibodies against glycoprotein E^{ns} and the non-structural NS3 protein is present in infected host. In the first generation marker / DIVA vaccines (E2 subunit vaccines), E^{ns}-specific antibodies in the ELISA respond positively in the animals infected with the wild type strain, whereas only CSFV E2 specific antibody responses develop in the vaccinated animals. As an alternative, detection of NS3

antibodies may be used as an option. E2 subunit marker vaccines safety has been confirmed but may have disadvantages over live vaccines (Blome et al. 2017a).

Some studies have been conducted on the basis of epitope vaccines (EVs), and also combined CSFV-E2 and NS3 vaccines have been produced to contribute to the development of the immunogenicity of E2 marker vaccines (Uttenthal et al. 2010).

In 2014, the vaccine "CP7_E2alf" was licensed as the first live attenuated marker vaccine against Classical Swine Fever (Blome et al. 2017b; Wei et al. 2021). This vaccine is based upon pestivirus chimera "CP7_E2alf" that carries the basic immunogen of CSF virus "Alfort/187" and glycoprotein E2, in a type 1 bovine viral diarrhoea backbone ("CP7") (Blome et al. 2017b).

Foot and Mouth Disease

In this disease, DIVA strategies are needed using serological tests (ELISA) to differentiate vaccinated animals (Uttenthal et al. 2016; Diaz-San Segundo et al. 2017). In contrast to vaccination, foot and mouth disease virus (FMD) infection reveals a powerful antibody response to NSP (nonstructural proteins) and viral proteins. Various tests based on different NSPs (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3ABC and 3AB) have been developed to differentiate vaccinated and non-infected animals from other vaccinated, which are afterwards clinically or subclinically infected with foot and mouth disease virus (Uttenthal et al. 2016; Bhatt et al. 2018).

Rift Valley Fever

The RNA genome of Rift Valley Fever Virus (RVFV) encodes 4 structural proteins and two non-structural proteins NSs and NSm, that play a significant role in viral pathogenesis. In addition, information on the molecular biology of RVFV was used to develop DIVA-compatible vaccines (Faburay et al. 2017). Vaccination policies and types of vaccines used may vary in non-endemic and endemic countries. In non-endemic countries, eradication and control programs are a major objective against outbreaks, and the use of vaccines that provide opportunity for DIVA is the best choice (Faburay et al. 2017; Wilson et al. 2021). In endemic countries, vaccine candidates that can be used to control rift valley fever are highly flexible. In this case, the use of DIVA vaccines may be a better choice if the goal is eradication. Vaccines such as VLPs, DNA vaccines and recombinant protein based vaccines are included in the DIVA-compatible vac-

cines group with no universal risk and high safety profile (Faburay et al. 2017).

In some studies, RVFV vaccines include deletion of NSs and NSm genes. These may be useful in controlling RVFV in endemic areas as well as for DIVA. However the accompanying diagnostic tests are not yet commercially present (Alhaj 2016).

Peste des petits Ruminants (PPR)

Conventional live vaccines used for PPR do not differentiate between vaccinated and infected animals. Therefore, it is important to develop vaccines suitable for the DIVA concept (Fakri et al. 2021). This concept may play a significant role in reduction of disease in endemic regions (Parida et al. 2015). Thus, adenovirus-based DIVA vaccines have been developed in East African goats against the peste des petits virus (PPRV) challenge. H and F are surface glycoproteins of PPRV. As a result the vaccine consisting of (AdF +AdH) appears to be successful and provides a DIVA vaccine potential when used in conjunction with the ELISA (Holzer et al. 2016).

Newcastle Disease

VLP (virus-like particle) vaccines have been indicated high levels of protection against different viral agents. In a study, Newcastle disease virus (NDV) VLP was developed and poultry immunized with NDV VLP vaccines. It has been strongly shown that the use of this vaccine in poultry may be a suitable strategy for control of NDV. Accordingly, the VLP vaccine and accompanying HI test may give opportunity to use the DIVA strategy (Park et al. 2014).

Infectious Laryngotracheitis

Distinction between ILTV (infectious laryngotracheitis virus) wild type strain and vaccine strains is essential for control of disease. ILTV DIVA vaccines are developed to overcome this problem (Shil et al. 2012). In one study, it was shown that the TaqMan real-time PCR test together with the ΔgG ILTV vaccine has the possible to be used in the DIVA strategy for control and eradication of ILT (Shil et al. 2014).

Bovine Tuberculosis

Bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis*, is an important economic and global animal welfare issue. The development of the DIVA test is required for slaughter control strategies in addition to traditional bovine vaccines in countries (Vordermeier et al. 2016a; García et al. 2020).

The DIVA test, based upon the interferon gamma blood test platform, is similar to the tests used

to diagnose human tuberculosis. The interferon gamma DIVA test is based on a response combination of 3 antigens, Rv3615c, CFP-10 and ESAT-6 (Conlan et al. 2015). Antigens used in blood tests were additionally evaluated for their use in skin tests (Vordermeier et al. 2016b). The DIVA skin test approach is effective in detecting infected animals without the use of immunomodulators, while giving negative results in non-infected or BCG-vaccinated cattle. There are also two skin tests that are potential for DIVA. Of these, APHA-1; is based on mixture of Rv3615c CFP-10, ESAT-6 proteins, while APHA-2; it is based on the Rv3020 protein in addition to the three proteins (Vordermeier et al. 2016a).

Paratuberculosis (Johne's Disease)

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) cause paratuberculosis in ruminants. Popular commercial paratuberculosis vaccines are prepared from whole cell killed MAP which will generate antibodies to cellular antigens. Nevertheless, field infected animals will have antibodies to both cellular and secreted antigens. A simple ELISA-based test, when used in conjunction with conventional ELISA protocols, can be used to differentiate between vaccinated and infected animals using MAP secreted antigens to diagnose paratuberculosis (Dhama et al. 2016).

Salmonella Infections

In *Salmonella* Choleraesuis DIVA vaccines, the *ompA* gene was deleted from live attenuated Δ*rpoS* and Δ*rpoP* vaccine strains. The *ompA* is found in whole *Salmonella enterica* serovars. The results show that *Salmonella* Choleraesuis Δ*rpoS* Δ*ompA* and Δ*rpoP* Δ*ompA* may be useful as DIVA strains carrying foreign antigens, thus generating new probability for the production of invaluable live vaccines for live animals. Also ELISA was used as differential test. Furthermore, these information show that *OmpA* may be proper negative marker for DIVA vaccines (Herrero-Gil et al. 2016).

For Pullorum disease, the *S. Pullorum* Δ*spiC* Δ*waaL* mutant strain was developed. In vaccine strain the truncated *Salmonella* lipopolysaccharides have a differentiating use as a serological marker. The efficacy, safety, and DIVA characteristics of this vaccine candidate were evaluated in broilers. The results show that the double mutant strain may be an effective, cross-protective and safe vaccine against *Salmonella* infection in a poultry in accordance with the requirements of the DIVA plan (Guo et al. 2017).

Brucella Infections

In a study, the modified *B. abortus* S19 strain called S19Δper was described. Deletion of the *perosamine synthetase gene* caused a significant attenuation of the mutant S19Δper without affecting the immunogenic properties. Then S19Δper DIVA capability was assessed by using Rose Bengal Plate Test. As a result the mutant S19Δper with a moderately similar phenotype showed a significant similarity to the S19 vaccine strain with improved immunogenicity, safety and DIVA properties for the bovine brucellosis control, and can thus be used as the DIVA vaccine (Lalsiamthara et al. 2015; Chaudhuri et al. 2021).

Mycoplasma Infections

The control strategy of the contagious bovine pleuropneumonia is to vaccinate with live attenuated strains. In addition, an lppQ-mutant of the current vaccine strain T1 / 44 has been developed. T1lppQ-mutant strain lacks lipoprotein LppQ, which provides a possible virulence of *M. mycoides* subsp. *mycoides*. TaqMan real-time PCR based upon the lppQ gene has been developed for the detection of mycoplasma and for the discrimination of wild-type strains from the lppQ- mutant vaccine strain. Consequently this has been described as a live DIVA vaccine strain. (Vilei and Frey 2010).

Table 1. DIVA (Marker) vaccines used in veterinary medicine (Capua et al. 2003; Arda and Sareyyüpoğlu 2004; Suarez 2005; Dong and Chen 2007; Meeusen et al. 2007; Uttenthal et al. 2010; Vilei and Frey 2010; Day and Schultz 2014; Park et al. 2014; Shil et al. 2014; Conlan et al. 2015; Lalsiamthara et al. 2015; Dhama et al. 2016; Herrero-Gil et al. 2016; Holzer et al. 2016; Vordermeier et al. 2016a; Vordermeier et al. 2016b; Blome et al. 2017a; Freuling et al. 2017; Muratore et al. 2017).

Disease	Causative Agent	DIVA/Marker Vaccine Strategy	Deleted Gene	Accompanying Test
Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)	Bovine herpesvirus	Gene deletion mutant virus	Glycoprotein E	ELISA for gE analysis
Avian Influenza (AI)	Avian Influenza virus	Subunit vaccine use	-	ELISA tests
		Non-structural protein 1 (NS1)	-	ELISA tests
		Heterologous neuraminidase (H7N2 (wild)/H7N3 (vaccine))	-	N2/N3 monitoring
Pseudorabies (Aujeszky's Disease)	Pseudorabies virus (PrV)	Gene deletion mutant virus	Glycoprotein E	ELISA for gE analysis
Classical Swine Fever (CSF)	CSF virus (CSFV)	E2 subunit vaccine use	-	ELISA tests
Foot and Mouth Disease (FMD)	FMD virus (FMDV)	Comparison of serologic response against nonstructural proteins (NSPs) with serologic response against vaccine antigens	-	ELISA tests
Peste des petits Ruminants (PPR)	PPR virus (PPRV)	Adenovirus-based vaccine use	-	ELISA tests
Newcastle Disease (ND)	ND virus (NDV)	Virus like particles	-	HI test
Infectious Laryngotracheitis (ILT)	ILT virus (ILTV)	Gene deletion mutant virus	Glycoprotein G	TaqMan real-time PCR
Bovine Tuberculosis	<i>Mycobacterium bovis</i>	APHA-1 or APHA-2 use	-	DIVA skin test approach
Paratuberculosis (Johne's Disease)	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Evaluation of MAP secreted antigens and cellular antigens	-	Classic and MAP secreted ag ELISA
Salmonella Infections	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	Gene deletion	<i>OmpA gene</i>	ELISA tests
Brucella Infections	<i>Brucella abortus</i>	Gene deletion	Per gene	Rose Bengal Plate Test
Contagious Bovine Pleuropneumonia	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	Gene deletion	Lipoprotein LppQ	TaqMan real-time PCR

Conclusion

DIVA strategies as a differentiation method between infected and vaccinated animals are significant tools for disease control and eradication. There is an important need to develop DIVA vaccines and accompanying tests, as they are predicted to be more effective for disease eradication than the standard vaccines used. These vaccines will also be an important approach for the control of infectious diseases that may emerge in the future. With the development of technologies in the field of veterinary medicine, the use of new DIVA strategies against various disease seems to be inevitable. These vaccine strategies have been tried to be developed for many animal disease agents and are still being studied today.

Financial Support and Conflicts of Interest Statement: There is no person / organization that financially supports the study and the authors have no conflict of interest.

References

- Akan M, Öncel T, Sareyyüpoğlu B, Hazıroğlu R, Tel OY, Cantekin Z. (2006) Vaccination studies of lambs against experimental *Manheimia* (Pasteurella) haemolytica infection. *Small Rum Res.* 65, 44-50.
- Alhaj M. (2016) Safety and efficacy profile of commercial veterinary vaccines against Rift Valley fever: a review study. *J Immunol Res.* 2016, 1-7.
- Arda M, Sareyyüpoğlu B. (2004) *Aşılar, Hazırlama Teknikleri, Avantaj ve Dezavantajları*. First edition. Ankara: İnkansa Publication, p.26-29.
- Arda M. (2011) *Temel Mikrobiyoloji*. Fourth edition. Ankara: Medisan yayınevi, p.459-468.
- Baron MD, Iqbal M, Nair V. (2018) Recent advances in viral vectors in veterinary vaccinology. *Curr Opin Virol.* 29, 1-7.
- Bhatt M, Mohapatra JK, Pandey LK, Mohanty NN, Das B, Prusty BR, Pattnaik B. (2018) Mutational analysis of foot and mouth disease virus nonstructural polyprotein 3AB-coding region to design a negative marker virus. *Virus Res.* 243, 36-43.
- Blome S, Moß C, Reimann I, König P, Beer M. (2017a) Classical swine fever vaccines-State-of-the-art. *Vet Microbiol.* 206, 10-20.
- Blome S, Wernike K, Reimann I, König P, Moß C, Beer M. (2017b) A decade of research into classical swine fever marker vaccine CP7_E2alf (Suvaxyn® CSF Marker): a review of vaccine properties. *Vet Res.* 48, 1-10.
- Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. (2003) Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* 32, 47-55.
- Chaudhuri P, Saminathan M, Ali SA, Kaur G, Singh SV, Lalsiamthara J, Goswami TK, Singh AK, Singh SK, Malik, Singh RK. (2021) Immunization with *Brucella abortus* S19Δper Conferred Protection in Water Buffaloes against Virulent Challenge with *B. abortus* Strain S544. *Vaccines.* 9(12), 1423.
- Conlan AJ, Pollock EB, McKinley TJ, Mitchell AP, Jones GJ, Vordermeier M, Wood JL. (2015) Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis. *PLoS Comput Biol.* 11, e1004038.
- Day MJ, Schultz RD. (2014) *Veterinary Immunology – Principles and Practice*. Second edition. Florida: CRC Press, p. 235-240.
- Dhama K, Datta M, Jain JN, Chaubey K. (2016) DIVA technology: indispensable tool for the control of John's disease. *J Exp Biol.* 4, 16-25.
- Diaz-San Segundo F, Medina GN, Stenfeldt C, Arzt J, de Los Santos T. (2017) Foot-and-mouth disease vaccines. *Vet Microbiol.* 206, 102-112.
- Dong XN, Chen YH. (2007) Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine.* 25, 205-230.
- Faburay B, Labeaud AD, McVey DS, Wilson WC, Richt JA. (2017) Current status of Rift Valley Fever vaccine development. *Vaccine.* 5(3), 29.
- Fakri FZ, Bamouh Z, Elmejdoub S, Elkarhat Z, Tadlaoui K, Chen W, Bu Z, Elharrak M. (2021) Long term immunity against Peste Des Petits Ruminants mediated by a recombinant Newcastle disease virus vaccine. *Vet Microbiol.* 261, 109201.
- Francis MJ. (2017) Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 48, 231-241.
- Freuling CM, Müller TF, Mettenleiter TC. (2017) Vaccines against pseudorabies virus (PrV). *Vet Microbiol.* 206, 3-9.
- Ganguly S, Padhy A, Para PA, Pandey AK, Praveen PK, Wakchaure R, Sahu A. (2015) DIVA Vaccines: A Brief Review on its Novel Facets for the Eradication of Infections of Livestock and Poultry. *World J Clin Pharmacol Microbiol Toxicol.* 1, 22-23.
- García EA, Blanco FC, Muñiz XF, Eirin ME, Klepp LI, Bigi F. (2020) Elimination of ESAT-6 and CFP-10 from a candidate vaccine against bovine tuberculosis impaired its protection efficacy in the BALBc mouse model. *Int J Mycobacteriol.* 9(4), 417.
- Guo R, Jiao Y, Li Z, Zhu S, Fei X, Geng S, Jiao X. (2017) Safety, protective immunity, and DIVA capability of a rough mutant *Salmonella* Pullorum vaccine candidate in broilers. *Front Microbiol.* 8, 547-557.
- Henderson LM. (2005) Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals.* 33, 203-209.
- Herrero-Gil A, Carrión J, Orden JA, De La Fuente R, Domínguez-Bernal G. (2016) Engineering of a live *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis negative-marker strain that allows serological differentiation between immunised and infected animals. *The Vet J.* 213, 53-58.
- Holzer B, Taylor G, Rajko-Nenow P, Hodgson S, Okoth E, Herbert R, Baron MD. (2016) Determination of the minimum fully protective dose of adenovirus-based DIVA vaccine against peste des petits ruminants virus challenge in East African goats. *Vet Res.* 47, 20-26.
- Lalsiamthara J, Gogia N, Goswami TK, Singh RK, Chaudhuri P. (2015) Intermediate rough *Brucella abortus* S19Δper mutant is DIVA enable, safe to pregnant guinea pigs and confers protection to mice. *Vaccine.* 33, 2577-2583.
- Lee CW, Senne DA, Suarez DL. (2004) Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. *Vaccine.* 22, 3175-3181.
- Liu F, Wu X, Li L, Ge S, Liu Z, Wang Z. (2013) Virus-like particles: promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36, 343-352.
- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 20, 489-510.

- Mettenleiter TC. (2020) Aujeszky's disease and the development of the marker/DIVA vaccination concept. *Pathogens*. 9(7), 563.
- Morgan AJ, Parker S. (2007) Translational Mini-Review Series on Vaccines: The Edward Jenner Museum and the history of vaccination. *Clin Exp Immunol*. 147, 389-394.
- Muratore E, Bertolotti L, Nogarol C, Caruso C, Lucchese L, Iotti B, Rosati S. (2017) Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis in marker-vaccinated dairy herds: Application of a recombinant gE ELISA on bulk milk samples. *Vet Immunol Immunopathol*. 185, 1-6.
- Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. (2013) *Kubby Immunology*. Seventh edition. New York: W. H. Freeman and Company, p. 574-582.
- Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, Muthuchelvan D, Buczkowski H, Banyard AC. (2015) Peste des petits ruminants. *Vet Microbiol*. 181, 90-106.
- Park JK, Lee DH, Yuk SS, Tseren-Ochir EO, Kwon JH, Noh JY, Park SY. (2014) Virus-like particle vaccine confers protection against a lethal newcastle disease virus challenge in chickens and allows a strategy of differentiating infected from vaccinated animals. *Clin Vaccine Immunol*. 21, 360-365.
- Pasick J. (2004) Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim Health Res Rev*. 5, 257-262.
- Petrini S, Righi C, Iscaro C, Viola G, Gobbi P, Scoccia E, Rossi E, Pellegrini C, De Mía GM. (2020) Evaluation of passive immunity induced by immunisation using two inactivated gE-deleted marker vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in Calves. *Vaccines*. 8(1), 14.
- Sareyyüpoğlu B, İzgür M. (1999) DNA immunizasyonu. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*. 10, 73-85.
- Selke M, Meens J, Springer S, Frank R, Gerlach GF. (2007) Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a Salmonella enterica serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. *Infect Immun*. 75, 2476-2483.
- Shil NK, Legione AR, Markham PF, Noormohammadi AH, Devlin JM. (2014) Development and validation of TaqMan real-time polymerase chain reaction assays for the quantitative and differential detection of wild-type infectious laryngotracheitis viruses from a glycoprotein G-deficient candidate vaccine strain. *Avian Dis*. 59, 7-13.
- Shil NK, Markham PF, Noormohammadi AH, O'rourke D, Devlin JM. (2012) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect chicken serum antibody to glycoprotein G of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis*. 56, 509-515.
- Singh A. (2021) Why not the 'marker' or DIVA vaccines for the control of emerging infectious diseases of humans?. *Vaccine*. 39, 1476-1477.
- Suarez DL. (2005) Overview of avian influenza DIVA test strategies. *Biologicals*. 33, 221-226.
- Sun Z, Wang Q, Li G, Li J, Chen S, Qin T, Ma H, Peng D, Liu X. (2021) Development of an Inactivated H7N9 Subtype Avian Influenza Serological DIVA Vaccine Using the Chimeric HA Epitope Approach. *Microbiol Spect*. 9, e00687-21.
- Utenthal A, Parida S, Rasmussen TB, Paton DJ, Haas B, Dundon WG. (2010) Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Expert Rev Vaccines*. 9, 73-87.
- Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, Stegeman JA. (1996) The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J Biotechnol*. 44, 75-81.
- Vilei EM, Frey J. (2010) Detection of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC in bronchoalveolar lavage fluids of cows based on a TaqMan real-time PCR discriminating wild type strains from an lppQ- mutant vaccine strain used for DIVA-strategies. *J Microbiol Methods*. 81, 211-218.
- Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. (2016a) Bovine tuberculosis in cattle: vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. *Annu Rev Anim Biosci*. 4, 87-109.
- Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG. (2016b) Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 181, 10-14.
- Wei Q, Liu Y, Zhang G. (2021) Research Progress and Challenges in Vaccine Development against Classical Swine Fever Virus. *Viruses*. 13(3), 445.
- Wilson WC, Faburay B, Trujillo JD, Ragan I, Sunwoo SY, Morozov I, Shivanna V, Balogh A, Urbaniak K, McVey DS, Bold D, Gaudreault NN, Schirtzinger EE, Ma W, Richt JA. (2021) Preliminary Evaluation of a Recombinant Rift Valley Fever Virus Glycoprotein Subunit Vaccine Providing Full Protection against Heterologous Virulent Challenge in Cattle. *Vaccines*. 9(7), 748.



Tavuklarda Coronavirus ve Enfeksiyöz Bronşitis aşıları

Özlem Kardoğan^{1*}

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü-Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 04.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 28.02.2022

Özet: IB, kanatlı hayvan endüstrisindeki özellikle genç ve yetişkin yumurtacı ve broyler tavukların, solunum ve ürogenital sistemlerinde lezyonlara yol açan bu nedenle karkas gelişimi ve yumurta kalitesinde düşmeye neden olan prevalansı yüksek ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu akut, yüksek derecede bulaşıcı viral bir enfeksiyondur. Hastalığın etkeni Coronaviridae ailesinde, Gammacoronavirüs'lar içerisinde yer alan Enfeksiyöz bronşitis virüsü (IBV)'dur. Kapsamlı aşılama olsa bile, ticari olarak IB salgınları kümes hayvanları üreticileri için önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Sürekli olarak yeni serotipler ve varyantlar ortaya çıkmakta, bu da kümes hayvanı üreticilerini ve hayvan sağlığı şirketlerini aşılama planlarını devamlı olarak değerlendirmeye ve yeni aşılar üretmeye zorlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Aşı, Enfeksiyöz Bronşitis, tavuk coronavirus

Coronavirus and Infectious Bronchitis vaccines in chickens

Abstract: IB is an acute, highly contagious viral infection responsible for the high prevalence and significant economic losses in the poultry industry, especially in young and adult layers and broiler chickens, which causes lesions in the respiratory and urogenital systems, resulting in reduced carcass development and egg quality. The causative agent of the disease is Infectious bronchitis virus (IBV), which is in the Gammacoronaviruses in the Coronaviridae family. Even with extensive vaccination, commercial outbreaks of IB remain a major problem for poultry producers. New serotypes and variants are constantly emerging, forcing poultry producers and animal health companies to continually evaluate their vaccination plans and produce new vaccines.

Keywords: Chicken coronavirus, Infectious Bronchitis, vaccine.

Giriş

Enfeksiyöz bronşitis (IB), kanatlı hayvan endüstrisindeki özellikle genç ve yetişkin yumurtacı ve broyler tavukların, solunum ve ürogenital sistemlerinde lezyonlara yol açan bu nedenle karkas gelişimi ve yumurta kalitesinde düşmeye neden olan prevalansı yüksek ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu akut, yüksek derecede bulaşıcı viral bir enfeksiyondur (de Wit ve ark. 2011).

IB enfeksiyonlarının her yaş grubundaki tavukları etkilemesi ve yüksek morbitideye sebep olması sebebiyle kanatlı endüstrisi için büyük tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle tüm dünyada yakından takip edilmektedir. Dünyada birçok ülkede farklı Enfeksiyöz bronşitis virüs (IBV) varyantları bulunmakta ve mücadele de sorunlar yaşanmaktadır.

Kümes hayvancılığı endüstrisinde yaygın olarak IBV'ne karşı aşılama yapılmasına rağmen, yeni serotiplerin ve varyantların ortaya çıkması nedeniyle hastalığın kontrolü zor olmaktadır. IBV aşıları için mevcut toplu uygulama stratejileri verimsizdir ve sıklıkla aşılama başarısızlıklarına neden olmaktadır.

IBV proteini ve konakçı hücre etkileşimleri hakkında yeterli bilgiye sahip olunmaması, hedeflenen aşı kontrol stratejilerini neredeyse imkansız hale getirmektedir.

Bu derleme de; IBV, aşıları, aşı teknolojisindeki son gelişmelerle birlikte mevcut durumun ana hatlarıyla özetlenmesi amaçlanmıştır.

Enfeksiyöz Bronşitis Virüs ve Aşılar

Enfeksiyöz Bronşitis Virüs (IBV)

IB, ilk kez 1930 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde tavuklarda akut solunum yolu hastalığı olarak tanımlanmış, 1936 yılında ise etkeni olan virüs (IBV) izole edilmiştir. Ülkemizde de ilk kez 1978 yılında Ankara'da tespit edilmiş ve 1980'li yıllarda tavuk yetiştiriciliğindeki hızlı artışa paralel olarak ülke genelinde yayılmıştır (Çöven 2012).

IBV Nidovirales sınıfında, Coronaviridae ailesi, Orthocoronavirinae alt ailesindedir. Orthocoronavirinae alt ailesinde 4 cins (Alfacoronavirus, Betaco-

ronavirus, Deltacoronavirus, Gammacoronavirus) tanımlanmıştır. IBV'ü grup 3'de yer alırken, diğer üç grupta memeli coronavirusları yer almaktadır (OIE 2018). Coronaviruslar segmentsiz, pozitif iplikcikli lineer yapılı RNA genomuna sahiptir. RNA yapısındaki genomun içerisinde S (spike), M (matriks), E (zarf) ve N (nükleokapsid) yapısal proteinlerini kodlayan genler bulunmaktadır. Virüs tropizmini belirleyen S proteini IBV'ye karşı oluşan antikorların bağlanacağı bölgeleri taşır (OIE 2018). Spike glikoproteini (S1 ve S2) iki alt birimden oluşmaktadır (Cavanagh 2003). Değişken S1 alt ünitesi konak hücreye tutunmayı, S2 alt ünitesi ise virüsün hücre içine girmesini sağlamaktadır (Cavanagh 1997; Jackwood 2012). IBV karakterizasyonu için hedef bölge, S glikoprotein geninin S1 alt birimidir (OIE 2018).

IBV'nin ilk izole edilen serotipi Massachusetts(-MASS)'dir. Valastro ve ark. (2016) S1 geninin tamamının dizilemesini yaparak tüm IBV'lerini 6 genotip ve 32 farklı viral soy altında sınıflandırmıştır. 27 soy, genotip I'de yer almış, kalan genotiplerin her biri bir soy içermiştir. Bu soylardan bazıları birkaç kıtaya, ülkeye veya bölgeye dağılmışken, bazıları da belirli coğrafi alanlara özgüdür. Her bir soy, her biri tür olarak adlandırılan ve belirli bir isim verilen (GA08, QX vb.) farklı virüsleri içermektedir (Tablo 1). Genel olarak serotip grupları, sınıflandırma sistemindeki genotip gruplarına karşılık gelmektedir (Aziz 2020).

Ülkemizde yapılan genotiplendirme çalışmalarında baskın genotipin İsrail varyant-2 olduğu bildirilmiştir (Kahya ve ark. 2013; Aral 2016; Yılmaz ve ark. 2016; Öngör ve ark. 2021).

Tablo 1. S1 gen dizisi veri analizlerine göre genogruplar, suşların adları ve sirküle olduğu dönemler (Valastro ve ark. 2016).

Genogrup (Soy)	Sirkülasyon dönemi	Suş adı	Köken aldığı ülke	Genogrup (Soy)	Sirkülasyon dönemi	Suş adı	Köken aldığı ülke
GI-1	1937–2013	Beaudette	USA	GI-18	1993–1999	JP8127	Japonya
GI-2	1954–2006	Holte	USA	GI-19	1993–2012	58HeN-93II	Çin
GI-3	1960–2006	Gray	USA	GI-20	1996–1999	Qu_mv	Kanada
GI-4	1962–1998	Holte	USA	GI-21	1997–2005	Spain/97/314	İspanya
GI-5	1962–2012	N1/62	Avusturalya	GI-22	1997–2011	40GDGZ-97I	Çin
GI-6	1962–2010	VicS	Avusturalya	GI-23	1998–2012	Variant 2	İsrail
GI-7	1964–2012	TP/64	Tayvan	GI-24	1998–2013	V13	Hindistan
GI-8	1965–1967	L165	USA	GI-25	2004–2013	CA/1737/04	USA
GI-9	1973–2011	ARK99	USA	GI-26	2006–2007	NGA/B401/2006	Nijerya
GI-10	1970s–2000s	B	Yeni Zelanda	GI-27	2008–2013	GA08	USA
GI-11	1975–2009	UFMG/G	Brezilya	GII-1	1979–1984	D1466	Hollanda
GI-12	1978–2006	D3896	Hollanda	GIII-1	1988–2008	N1/88	Avusturalya
GI-13	1983–2013	Moroccan-G/83	Fas	GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA
GI-14	1984–2006	B1648	Belçika	GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA
GI-15	1986–2008	B4	Kore	GV-1	2002–2008	N4/02	Avusturalya
GI-16	1986–2011	IZO 28/86	İtalya	GVI-1	2007–2012	TC07-2	Çin
GI-17	1988–1999	CA/Machado/88	USA	GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA

Jungherr ve ark. (1956)'da, farklı IBV serotiplerinin çapraz koruma sağlamadığını bulmuştur. Bu keşiften günümüze, antikorları nötralize ederek tanımlanan birçok farklı serotip ve spike geninin çıkarılmış amino asit sekansına dayanan genetik tipler dünya çapında tanımlanmıştır. Bazı istisnalar olmasına rağmen (Cavanagh ve ark. 1992; Li ve ark. 2011)

IBV tipleri arasındaki çapraz korumayı tahmin etmek için, virüslerin S1 amino asit dizisi arasındaki genetik ilişki kullanılabilir (Cavanagh ve ark. 1997; Lee ve ark. 2003; Ladman ve ark. 2006; Jackwood 2012).

IB, zor soluma, öksürük, trakeal raller(ses), hapşırma ve burun akıntısı ile karakterizedir. Genç hayvanlarda ciddi solunum sıkıntısı ve özellikle civciv-

lerde semptomlara ilave olarak burun akıntısı oluşturmaktadır (Esendal 2002). Bu virüs, solunum sistemi dışında da böbrek ve genital sistem epitelyal hücrelerin çoğunda çoğalarak patolojik değişikliklere neden olabilmektedir (Boltz ve ark. 2004). IB'ye yakalanan sürüler genellikle %100 morbidite gösterir. Mortalite, nefritis ve çoğunlukla solunum sistemine yerleşen başta *Escherichia coli* olmak üzere *Mycoplasma spp.* gibi bakteriyel kaynaklı sekonder enfeksiyonlar sebebiyle yükselmektedir (Cavanagh 2003). Yumurtacılar, yumurta veriminde düşüş görülmektedir. Özellikle yumurta üretiminin başlangıcında sürüde IB enfeksiyonun yaşanması durumunda verim düşüşünü %70'e kadar çıkabilmektedir. Bu gibi durumlar kanatlı hayvan yetiştiricileri için ciddi ekonomik kayıp yaratmaktadır. Ülkemizde Connecticut, H120, MA5 ve M41 gibi farklı suşlarla IB'ye karşı aşılama yapılmasına rağmen, halen birçok IB şüpheli salgınlar yaşanmaktadır (Kahya ve ark. 2013).

Aşılama

Aşılar

Kanatlı hayvan endüstrisindeki en çok canlı attenüe aşılar kullanılmaktadır. Attenüe canlı IBV aşıları patojen IBV izolatlarının embriyolu tavuk yumurtasında (EYT) seri pasajıyla üretilir. Aşıların anttenüe olduğuna, inokulasyondan sonra klinik semptomlara rastlanmamasıyla karar verilmektedir (Jordan 2017).

Bir saha virüsünün virulensini azaltmak 1 yılı kadar sürebilmektedir, ancak hızlı virülensi düşürmek için bazen ısıtma işlemi ve sınırlı sayıda yumurta geçişinin birlikte kombinasyonu ile elde edilebilmektedir (Jackwood ve ark. 2010). Ölü veya inaktive edilmiş IBV aşıları yumurtacı/damızlık tipi tavuk yetiştiriciliklerinde kullanılmaktadır. Rutin olarak canlı IBV'nin izolatlarının inaktivasyonunda formaldehit kullanılmaktadır. İlk üretilen aşı olan MASS serotipli IBV aşısı, tüm dünyada uzun yıllardır kullanılan tek aşıdır. Kümes hayvanı üretimi yapan birçok ülkede, aynı zamanda tek lisanslı IBV'u aşı serotipidir (Jordan 2017).

Yeni serotip ve varyantlar ortaya çıktıkça, bölgesel olarak önemli serotiplerle mücadele etmek için aşılar sürekli yeni serotiplerle üretilmiştir (Arkansas, Connecticut, Gürcistan 98, 793/B, QX, Q1 gibi) (Jackwood 2012). Tek başına IBV antijenlerini eksprese (Johnson ve ark. 2003; Toro ve ark. 2014; Li ve ark. 2016) eden veya diğer patojenlerin antijenleriyle kombinasyon halinde rekombinant IBV aşılar geliştirilmiştir (Yang ve ark. 2016; Yin ve ark. 2016). Ancak bu aşılar henüz canlı-attenüe aşılarla aynı koruyucu

seviyeyi göstermemiştir. Şu anda, kullanılan lisanslı ticari rekombinant IBV aşısı bulunmamaktadır (Jordan 2017).

Aşılama Zamanı

IBV'ye karşı aşılamamanın zamanlaması yetiştirme tipine ve türe göre değişmektedir. Broilerlerin yaşam süresi kısadır ve IB'ye karşı az sayıda aşılanmaktadır. Genel olarak, yumurtadan çıkan civcivler kuluçkahane 1-3 serotipli canlı-attenüe IBV aşılılarıyla aşılanmaktadır. Daha uzun yaşam süreli piliçler (>49 günlük), broiler kümelerinde bağışıklık süresini uzatmak amacıyla 14 ila 18 günlükten tekrar aşılanmaktadır. Broiler damızlık ve yumurtacı tavuklar çok daha uzun yaşam sürelidir ve piliç kümesinde canlı attenüe aşı ile 2 haftalıktan başlayarak IB'ye karşı çoklu aşılar, ardından 4 ve 6 haftalıktan canlı-attenüe aşılar ile aşılanmaktadır (Jordan 2017). Tavuklar yumurtlamaya başladıktan sonra, verilen tüm IBV aşıları inaktiftir ancak bazı entegreler bölgede, bir enfeksiyon durumu varsa canlı attenüe aşı da kullanılabilmektedir. Canlı attenüe ve inaktif IBV aşılarının uygulama zamanının ayarlanabilmesi, her üreticiye uygun en iyi aşı programının belirlenebileceği etkili aşılama stratejilerini yapmak zordur. Ayrıca aşılama stratejisi belirlenirken kullanılan aşıların NDV aşılı ile birleştirildiği için bunun da başka bir karmaşıklık ve değişkenlik katmanı eklediği düşünülmelidir (Jordan 2017).

Aşılama Programları

IBV'de, çapraz koruma sağlamayan çok sayıda farklı tür var olduğundan, kontrol edilmesi çok zor bir enfeksiyondur. Attenüe canlı aşılar broilerlerde ve yumurtacı yarkalarda, inaktif aşılar ise genellikle yumurtacı ve damızlıklarda kullanılmaktadır. Etkili kontrol, hastalığa neden olan virüs tipinin tanımlanmasını ve ardından bu türe karşı uygun bir aşı ile aşılamayı içermektedir. Bununla birlikte, kullanımda olan yalnızca birkaç farklı IBV'ü aşı suşu türü vardır, oysa virüsün hastalığa neden olabilecek sayısız farklı türü ve varyantı tüm dünyada bulunabilmektedir. Buna ek olarak, bazı ülkeler yalnızca bir veya birkaç aşı türü ile aşılamaya izin vererek kontrolü daha da zorlaştırmaktadır (Cavanagh ve Gelb 2008). Kanatlı hayvan üreticileri birden fazla serotipli aşılarla sürülerini koruma genişliğini arttırabilmektedirler. Bu çoklu serotipli aşılama stratejileri en az iki serotiple veya sürüdeki görülen diğer serotiplere göre belirlenebilmektedir. IBV'nin sürekli gelişimi ve aşıları sürekli güncelleme ihtiyacı, bu aşılama stratejisinin dezavantajıdır (Jackwood ve Wit. 2013). Çoklu serotip aşılamada kullanılan ikinci bir strateji de, IBV aşısının

sadece iki serotipinin uygulanmasıyla heterolog virüs türlerine karşı geniş çapraz koruma (Cook ve ark. 1999) sağlamak amaçlanmıştır. Bu strateji "koruyucu tip" olarak adlandırılmıştır. Massachusetts-tipi (MA5) ve IB 4/91 aşılarının birlikte kullanımı tek başlarına kullanımlarına oranla çok daha iyi çapraz koruma oluşturmuştur (Jordan 2017).

Aşılama Uygulamaları

Sprey aşılama

IBV'ü aşılı, kuluçkahanelerde sprej olarak rutin uygulanmakta (Purswell ve ark. 2008) ve her gün binlerce civciv aşılanabilmektedir. Genelde sprej kabinleri, bir tank ya da bir aşı haznesinden oluşmaktadır. Aşı, üretici firma talimatlarına göre kuluçkahane bulunan aşı haznelere yerleştirilerek yapılmaktadır (Jordan 2016).

Sprej aşılamının etkinliğini değerlendirmek için nispeten az sayıda laboratuvar çalışması yapılmıştır. Roh ve ark. (2015)'i elektron mikroskopunu kullanarak yaptıkları araştırma sonuçlarında, tekli IB aşı virüslerinin spreylemeden sonra yapısal hasara uğradığına dair herhangi bir kanıt rastlanmamıştır ancak uygulama işlemi sırasında aşıya uygulanan mekanik kuvvetten dolayı titre kaybedebileceğini bildirmişlerdir. Bu durum, birçok virüsün sprej uygulama sürecini bozulmadan geçtiğini, ancak bazılarının etkisiz hale gelebileceğini göstermektedir. Farklı çalışmalarda, püskürtme memesinden çıkan aşı ile civcivlerin seviyesine gelen aşı karşılaştırılırken titre de önemli bir düşüşün olduğu görülmüştür. Böyle bir durumda virüsün püskürtme işlemi sırasında çevreye saçıldığını düşündürmektedir (Jordan 2016).

Kanatlılarda günümüzde kullanılan sprej uygulama ekipmanları yaklaşık 40 yıldır değişmemiştir. Ekipman inovasyonları yapılmadan daha çok yeni aşı uygulama teknolojileri geliştirilmiştir (Jordan 2017).

Jel aşılama

IBV aşı uygulamasında en yeni teknoloji olan jel seyrelticiler, başlangıçta IBV aşılı için tasarlanmamıştır ancak bu amaç için uyarlanmıştır. Bu sistemde, aşı kalın bir jel seyreltici ve jel aracılığıyla sepetlerdeki veya kuluçkadaki civcivlere uygulanmıştır. Aşı, damlacıklar halinde civcivlerin üzerine püskürtülme ve civcivler birbirlerini gagalayarak aşıyı almaktadırlar. Gagalara bakılarak, civcivlerin aşıyı alıp almadıkları kontrol edilebilmektedir. Bu aşılama tipi, sprej aşılamaya kadar etkilidir. Jel aşılamasını IBV için sprej aşılamaya alternatif olarak kullanılması için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Jordan 2017).

Aşılama Sonrası Korumanın Değerlendirilmesi

Amerika da çalenç (epruvasyon) sonrası aşı etkinliği değerlendirirken ETY'de yeniden virüs izolasyonu yapılmaktadır (USDA 1999). Ancak diğer ülkelerde aşı etkinliği, siliostas testine göre yapılmaktadır (Pharmacopoeia 2016). Ayrıca çalenç sonrası kanatlı hayvanlarda klinik solunum semptomları ve tracheanın histopatolojisi incelenerek değerlendirme yapılabilmektedir. Moleküler analizler hem aşılama sonrası hem de çalenç sonrası kullanımı popüler hale gelmiştir. Bu yöntemler aşağıda detaylı anlatılacaktır.

Virüs izolasyonu

Çalenç sonrası ETY'de IBV izolasyon metodu her zaman altın standart test olmuştur (Jackwood, de Wit 2013) ve halen rutin olarak yapılmaktadır. Sonucun negatif olduğu virüs izolasyon testi, bir tavuğun virüssüz olduğunu ve aşının, en yüksek koruma biçimi olan sterilize edici bağışıklığı sağladığını göstermektedir. Ancak bu test maliyetli, zaman alıcı ve SPF (Specific Pathogen Free) yumurtaların her zaman sağlaması zordur. Bu test aynı zamanda nötralize edici antikorları indükleyen aşılama stratejileri için uygundur. Bu testin dezavantajlarında biri de, aşı suyu ve patojenik suş arasında ayırım yapmamasıdır. Aşılama devam ederken, virüs izolasyonu testindeki pozitif bir sonuç aslında aşı olabilir. Bu durum da, gerçek sonucunu belirlemek için başka testlerin yapılmasını gerektirmektedir (Jordan 2017).

Siliostas Testi

Trachea'nın yüzeyini tamamen örten silia adı verilen kıl benzeri yapıların arasında yer alan salgı hücreleri tarafından üretilen mukus, yabancı ajanları tutmaktadır. Siliaların tek-yönlü koordine hareketinin yardımı ile yabancı cisimler uzaklaştırılır. Bu hareketlerle birincil ve ikincil bakteriyel enfeksiyonlar karşı koruyucu bariyer oluşmaktadır. Silialarda kayıp ve deformasyonlar solunum sistemin savunma yeteneğinde kayba neden olmaktadır. Bu nedenle aşı virüsleri, hastalıklardan korunma da önemli olan bu mekanizmaya minimum düzeyde deformasyon yapmalıdır. Siliostas testi ile trachea'nın siliar aktivitesi incelenmektedir. Silia aktivitesi %50 veya daha altına indiğinde trachea, sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı korunamaz. Aşılanmış kanatlılarda korunma seviyesini ölçerken en düşük skor, aşılama programı ile sağlanan en yüksek (çapraz) korunma derecesini göstermektedir (Cook ve Jackwood 2020). Bu test sahada hangi aşı

programının denemeye değer olduğuna dair bir gösterge vermektedir.

Kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu(qRT-PCR)

Moleküler teknolojiler ilerledikçe ve daha fazla ekonomik hale geldikçe, çalenç sonrası kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yaygın bir kullanıma girmiştir. qRT-PCR testleri genel olarak tüm IBV türlerini veya bireysel serotip virüslerini spesifik olarak tespit etmek için (Roh ve ark. 2014) geliştirilmiştir (Callison ve ark. 2006), IBV için genel qRT-PCR testi, viral RNA genomunun farklı IBV türleri arasında yüksek oranda korunan bir bölümünü hedefleyerek, IBV'nü tespit etmek için uygun hale gelmiştir ancak bu yöntemle IBV genotipi ayırt edilememektedir. Genotipe özgü qRT-PCR testleri, serotip ile ilişkili olan çok çeşitli değişken gen bölgelerine (HVR) ait dizilerini hedeflemektedir. qRT-PCR'la, aynı zamanda virüs izolasyonu kadar hassas ve bazı durumlarda daha hassas sonuçları (Roh ve ark. 2014) tek bir günde alınabilmektedir. Yayınlanmış serotip spesifik qRT-PCR testleri oldukça spesifiktir hedef serotip için pozitif olan test başka bir serotip için negatif olacaktır. Başka serotipin varlığı veya yokluğu hakkında herhangi bir bilgi verilmemektedir (Jordan 2017).

Aşı Etkinliği Değerlendirme Yöntemlerinin İlişkisi

Aşı etkinliği değerlendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Jackwood ve ark, (2015)'ı, korumayı değerlendirirken, klinik semptomlar, siliostas, çalenç virüsünün tespiti ve trakea'daki mikroskopik lezyonların varlığına göre değerlendirme yapılabileceğini bildirmişlerdir. Bu dört kriterin tümü, IBV ile çalenç'in ardından tamamen korunan (aşılı) hayvanlarda negatif, duyarlı (aşısız) hayvanlarda tamamen pozitif olduğunu, aralarında iyi bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Kullanılan değerlendirme metodu, aşı üretim çalışmaları ve çalenç sonucunu büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Kullanılan kanatlı türü (SPF-broiler), maternal antikor durumu, aşılama yaşı, aşı uygulama yöntemi, çalenç zamanlaması, çalenç virüsünün titresi ve korumayı değerlendirmek için kullanılan yöntemlerin tümü deneyin sonucunu etkilemektedir (Jordan 2017).

Yeni Nesil Aşılar

Son 20 yılda yeni aşı geliştirme denemeleri olmuştur. Halen en yaygın olarak canlı-attenué aşılar kullanılmaktadır (Bande ve ark. 2015). Yeni aşı teknolo-

jisi gelişimi yavaş ilerlemektedir. Çünkü yeni IBV aşı teknolojilerinin kullanımını sınırlandıran 2 faktör bulunmaktadır. Birincisi maliyettir. Çünkü ticari kanatlı kümeslerinde hayvan başına düşecek ek maliyet önemlidir (Jordan 2017). Diğer kanatlı patojenlerine karşı kullanılan standart rekombinant aşılar, canlı attenué veya inaktif IBV aşılara göre çok daha pahalıdır, ancak yine de kullanım kolaylığı ve etkinliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. İkinci sınırlandırıcı faktörse uygulama yöntemidir. Etlik piliçler kuluçkahane çıkım makinesine transfer edilirken in-ovo olarak veya yumurtadan çıktığı gün toplu olarak aşılanmaktadır. Yumurtacı / damızlık tavuklar canlı IBV aşıları ile sprey yoluyla birçok kez aşılanmaktadır.

Yeni aşı adaylarının virüsün ana giriş yeri olan solunum yolunda koruma sağlamak için gerekli bağışıklık mekanizmalarını uyarması önemlidir. Humoral ve hücre aracılı reaksiyonlar dahil olmak üzere mukozal bağışıklığı indüklemelidirler. Ayrıca kanatlı üretiminde kullanılabilmeleri için toplu aşılamının uygulanabilirliğini sağlanmalıdır (Rautenschlein 2021). Toplu olarak uygulanamayan ve etkili olmayan herhangi bir aşı, kanatlı endüstrisinin geniş ölçekli üretim uygulamaları ile uyumlu olmayacaktır (Jordan 2017).

Rekombinant aşılar

Moleküler biyoloji ve genetik bilim dallarının gelişimine paralel olarak, birçok hastalığa karşı kullanılmakta olan rekombinant aşılar geliştirilmiştir. Rekombinant aşılar, kanatlı endüstrisinde de kullanılmaktadır. En yaygın olarak hindilerin herpesvirüsü (HVT) veya kümes çiçeği virüsü vektör olarak tercih edilmektedir. NDV'nin antijenik proteinleri kodlayan genleri (Morgan ve ark. 1992), Enfeksiyöz Bursal hastalık virüsü (IBDV) (Darteil ve ark. 1995) ve Enfeksiyöz Laringotrakeit virüsleri (ILT) gibi viral konaklara yerleştirilmiş ve tavuklarda uygun bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için etkili bir şekilde kullanılmıştır. Spike geninin S1 bölümünü (Johnson ve ark. 2003; Toro ve ark. 2014) ifade eden kısımlar bu viral omurgalar kullanılarak rekombinant IBV aşısı geliştirmek için girişimler yapılmıştır. Henüz ticari bir ürün ortaya çıkmamıştır (Jordan 2017).

Rekombinant aşı teknolojisi, proteinlerin rekombinant ekspresyonunu ve viral vektörleri içermektedir. Bu sayede, kültürlenmesi zor olan veya kültürü yapılamayan virüslere karşı aşı geliştirilebilmektedir. Geleneksel yöntemlere göre daha kontrollü biyoproseslerle kısa sürede üretim sağlandığından güvenlik riskleri elimine edilebilmektedir (Hudu ark. 2016).

Subunit, peptit ve DNA aşılı

Subunit, peptit ve DNA aşılı, konakçı bağışıklık sistemine antijen sunularak hastalık etkenine karşı antikor gelişimi uyarma temeline dayanmaktadır. Subunit aşılı bir patojenin antijenik komponentlerinin (pilus, flagella, kapsül, protein, glikoprotein, toksin, vs.) direkt uygulanmaktadır. Peptid aşılılarında bir patojenin antijenik proteininden türetilen amino asitler kullanılır. Plazmit bazlı olmayan nükleik asitler ve plazmit bazlı DNA aşılılarında, bir antijeni kodlayan protein kısmı konakçı hücre içerisine verilmektedir. Bu aşılı türlerini inceleyen (Yang ve ark. 2009; Guo ve ark. 2010; Fang ve ark. 2013) bazı araştırmacılar bu aşılılara karşı gelişen bağışıklık tepkisinin; bağışıklık faktörlerinin (sitokinler vs) veya adjuvantların eklenmesiyle güçlendirileceğini bildirmişlerdir. Ancak bu aşılıların etkili olabilmesi için, birçok kez kas içine enjekte edilmesi gerekmektedir ki bu da büyük ölçekli kümes hayvanı üretiminde mümkün değildir. Çünkü maliyetleri yükseltecektir (Jordan 2017).

Ters genetik metodu ile oluşturulan rekombinant IBV aşılı

Piyasada bulunmasa da en umut verici yeni nesil aşılı adayı, ters genetik sistem tarafından üretilen rekombinant IBV'dür. Bu aşılı, bir IBV aşılı virüsünün genomunun klonlanarak homolog rekombinasyon, PCR yoluyla veya ilgili diğer genlerin doğrudan genoma klonlanmasıyla elde edilebilmektedir (Britton ve ark. 2005; Casais ve ark. 2005).

Bu tersine mühendislik uygulanmış genomlar daha sonra genomu kopyalayacak, montaj için gerekli viral proteinleri üretecek ve tamamen işlevsel bir IBV verebilecek uygun bir hücre kültürü sistemine transfer edilir. Rekombinant IBV ilgili yapılan araştırmaların çoğu, IBV genomunu eksprese eden viral proteinlerin işlevini ve konakçı hücre etkileşimlerini ortaya çıkarmak için yapılmıştır. Ancak aşılı geliştirmeye yönelik araştırmalar da devam etmektedir (Casais ve ark. 2005; Cavanagh ve ark. 2007).

Rekombinant bir IBV'de spike geninin çıkarılmasının ve bunun farklı bir IBV serotipinden spike geniyle değiştirilmesiyle, virüs yeni bir serotipe dönüştürülmektedir. Yeni oluşturulan rekombinant IBV daha sonra spike genini içeren patojenik virüse karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için kullanılabilir (Hodgson ve ark. 2004; Armesto ve ark. 2011). Bu teknolojiyle daha az zamanda aşılı üretilmektedir. Rekombinant IBV aşılılarının diğer aşılılara avantajları bulunmaktadır. İlk olarak, rekombinant IBV'ler canlı virüslerdir ve geleneksel bir IBV aşılısının yapacağı gibi enfeksiyon, replikasyon ve bir

bağışıklık tepkisi oluşturabilir. Bu virüste tüm proteinler mevcut olduğu için spike dışında immünojenik proteinlere de bir yanıtın oluşturulması sağlanabilmektedir. İkincisi, IBV genomu tarafından kodlanan tüm proteinlerin işlevi bilindikçe, IBV'nün ETY'e adaptasyonuna dayanmadan stratejik olarak rekombinant IBV'lerinin patojenitesi değiştirilebilir hale gelmiştir. Üçüncü olarak spike proteinindeki gen alışverişi ile yeni aşılı üretimindeki ilerlemeler tahmin edilebilmektedir. Mevcut canlı-attenüe aşılıların genomları, spike geninin dışındaki birçok yerde değişiklik gösterebilir ve bu da yeni aşılıların davranışının tahminlerini zorlaştırmaktadır. Dördüncü avantajı ise, rekombinant IBV'ler, kanatlı aşılılarının uygulama ve maliyet modeline uygundur. Canlı virüs oldukları için geleneksel yöntemlerle veya hatta bazı durumlarda in-ovo uygulanabilirler (Cavanagh ve ark. 2007). Rekombinant virüsü oluşturmanın ilk maliyeti, geleneksel ETY'de pasaj yönteminden önemli ölçüde daha yüksektir, ancak bu tek seferlik bir maliyettir. Rekombinant IBV üretildikten sonra, diğer IBV aşılıları gibi çoğaltılabilir ve EYT'de muhafaza edilebilir. İlk üretim maliyetinin etkisi, aşılıın uzun süreli kullanımına yayılabilir ve bu nedenle doz başına maliyeti yalnızca minimum düzeyde etkileyecektir. Rekombinant IBV aşılılarının çalışmalarında ruhsatlandırma da büyük bir engel oluşturmaktadır. Şu anda, her yeni rekombinant aşılı amacıyla oluşturulan IBV'nin, yeni virüsün lisanslaması için iki yıl veya daha uzun süre beklenmesi gerekmektedir (Jordan 2017).

Genetik olarak değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) olduklarından, rekombinant IBV'lerin kullanımı düşünüldüğünde halkın algısı da dikkate alınmalıdır. GDO'lara genel halk yaklaşımı iyi değildir ve bu da bu tür aşılıların kullanımlarını etkileyebilecektir (Jordan 2017).

Sonuç

IB, dünyada ve ülkemizde kanatlı endüstrisindeki yumurta üretim miktarını ve kalitesini etkileyen en önemli viral enfeksiyonlardan biridir. Tavukçuluk sektöründe sürülerde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonun kontrolünde sıkı biyogüvenlik önlemleri ile birlikte kanatlıların IBV suşlarıyla mücadeleye karşı direncini arttırmak için aşılamanın büyük etkisi söz konusudur.

Sprey olarak uygulanan canlı attenüe aşılılar yerel ve hücresel aracılı bağışıklığı uyarmaktadır. Harderian ve lakrimal bezler lokal IgA üretirken aktive CD8+ ve CD4+ lenfositler solunum yolunun enfeksiyondan temizlenmesinde etkili olurlar. Aşılama sonucunda dolaşımda bulunan antikorlar (çoğunlukla

Ig G) virüsün solunum yolundan böbrekler ve üreme sistemi dahil diğer duyarlı organlara yayılmasını sınırlandırır (Aziz 2020). Aşılanmanın immunizasyonunu, sürünün aşılama takvimi, sürü için seçilen aşı tipi, aşının uygulama yolu, uygulama tekniği, aşılanan kanatlıların sağlığı ve aşı ekibinin uygulama becerisi etkilemektedir. Saha da uygulanan aşı programları IBV'nun bölgedeki sirkülasyonu ve aşılanacak sürünün durumuna göre farklılık gösterebilir. Bunların yanında saha şartları altında yapılan aşılamalarda, çiftlikteki hijyen şartları ve sevk idare yöntemleri de büyük önem taşıdığı için aşılarından tam anlamıyla koruma beklemek gerçekçi olmayacaktır (Goncagül ve ark. 2020).

Kapsamlı aşılama olsa bile, ticari olarak IB salgınları kümes hayvanları üreticileri için önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Sürekli olarak yeni serotipler ve varyantlar ortaya çıkmakta, bu da kümes hayvanı üreticilerini ve hayvan sağlığı şirketlerini aşılama planlarını sürekli olarak değerlendirmeye ve yeni aşılar üretmeye zorlamaktadır. IBV aşı kombinasyonları üzerine yapılan araştırmalar ve saha verileri, bazı kombinasyonların heterolog enfeksiyonlara karşı çapraz koruma sağlayabildiğini ve üreticilerin kanatlı hayvan sağlığını korurken aşı programlarını basit tutmalarına izin verdiğini göstermektedir.

Yeni aşı teknolojileri üzerine yapılan araştırmalar, IBV ile ilgili bilgilerimizin sürekli olarak artışı daha iyi kontrol stratejilerine yol açarken, uygulama yöntemlerine odaklanılarak da, zayıf teknik nedeniyle aşılama başarısızlıklarının ortaya çıkmasını sağlamacaktır.

Kaynaklar

- Aral EM. (2016) Türkiye'de Enfeksiyöz Bronşitis Viruslarının RT-PCR ile Saptanması ve Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üni. Sağ. Bil. Ens. Doktora Tezi.
- Armesto M, Evans S, Cavanagh D, Abu-Median AB, Keep S, Britton P. (2011) A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. *PLoS One* e24352.
- Aziz T. (2020) Avian infectious bronchitis virus: infection, evolution, and immunity <https://www.thepoultrysite.com/articles/avian-infectious-bronchitis-virus-infection-evolution-and-immunity>. Erişim tarihi: 06.12.2020.
- Bande F, Arshad SS, Hair Bejo M, Moeini H, Omar AR. (2015) Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J. Immunol. Res.* 1–12.
- Boltz DA, Nakai M and Bahra JM. (2004) Avian infectious bronchitis virus: A possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.* 48: 909–915.
- Britton P, Evans S, Dove B, Davies M, Casais R, Cavanagh D. (2005) Generation of a recombinant avian coronavirus infectious bronchitis virus using transient dominant selection. *J. Virol. Methods* 123. 203–211.
- Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW. (2006) Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods* 138, 60–65.
- Casais R, Davies M, Cavanagh D, Britton P. (2005) Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J. Virol.* 79, 8065–8078.
- Cavanagh D, Davis DJ, Cook J, Li D, Kant A, and Koch G. (1992) Location of the amino acid differences in the SI spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 21: 33–43.
- Cavanagh D, Elus MM, and Cook JK. (1997) The pathogenicity of new variant IBV isolates need sequence variation in the SI spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26:63.
- Cavanagh D. (2003) Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experience of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32(6), 567–582.
- Cavanagh D, Casais R, Armesto M, Hodgson T, Izadkhasti S, Davies M, Lin F, Tarpey I, Britton P. (2007) Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. *Vaccine* 25, 5558–5562.
- Cavanagh D, Gelb J. (2008) Infectious bronchitis. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. eds. *Diseases of Poultry* 12th. pp. 117–135. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Cook J, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. (1999) Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477–485.
- Cook J ve Jackwood M. (2020) Enfeksiyöz Bronşitis www.enfeksiyoz-bronsitis.com. Erişim Tarihi:27.11. 2020.
- Çelebi M. (2009) Yeni Bir Enfeksiyöz Bronşitis Virüsü Olan 4/91 (793b)'in Ege Bölgesinde varlığının Ortaya Konulması. Doktora Tezi Adnan Menderes Üni. Sağ. Bil. Ens.
- Çöven F. (2012) Kanatlıların Enfeksiyöz Bronşitis Hastalığı Yumurta Bülteni. s:10;14–16.
- Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Riviére M. (1995) Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology* 211, 481–490.
- de Wit JJ, Cook JK, Van Der Heijden HM. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223–235.
- Esendal MÖ. (2002) Enfeksiyöz Bronşitis, Kanatlı Hayvan Hastalıkları İzgür M, Akan M, eds. Medisan Yayınları.50. Ankara, 155–162.
- Fang Y, Yujun Z, Yongting H, Jianyang Q, Wenxin L, Wenhui J, Xuying L, Qian W, Xiumin S, Zhong L. (2013) Protection of chickens against infectious bronchitis virus with a multivalent DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine. *J. Vet. Sci.* 14, 53–60.
- Goncagül G, Kardoğan Ö, Günaydın E. (2020) İç Anadolu'da enfeksiyöz bronşit virüsü aşılamasının etkinliği. *Etlık Mikrobiyoloji Derg.* 31(2), 147–153.
- Guo Z, Wang H, Yang T, Wang X, Lu D, Li Y, Zhang Y. (2010) Priming with a DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine enhance the immune response against infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods* 167, 84–89.

- Hodgson T, Casais R, Dove B, Britton P, Cavanagh D. (2004) Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. *J. Virol.* 78, 13804–13811.
- Hudu SA, Shinkafi SH, Umar S. (2016) An overview of recombinant vaccine technology, adjuvants and vaccine delivery method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 8(11): 19–24.
- Jackwood MW. (2012) Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World *Avian Diseases.* Vol. 56, No. 4 pp. 634–641.
- Jackwood MW, de Wit S. (2013). Infectious bronchitis. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. Eds. *Diseases of Poultry.* Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Ames, IA. pp. 139–160.
- Jackwood MW, Hilt DA, Sellers HS, Williams SM, Lasher HN. (2010) Rapid heat-treatment attenuation of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 39, 227–233.
- Jackwood MW, Jordan BJ, Roh HJ, Hilt DA, Williams SM. (2015) Evaluating protection against infectious bronchitis virus by clinical signs, ciliostasis, challenge virus detection, and histopathology. *Avian Dis.* 59, 368–374.
- Johnson MA, Pooley C, Ignjatovic J, Tyack SG. (2003) A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21. 2730–2736.
- Jordan BJ. (2016). Spray Application of Infectious Bronchitis Virus Vaccines in the Hatchery: How Efficient are We? XXIV Congreso de Avicultura Centroamericana y del Caribe. Erişim adresi: www.anaviguatemala.org/xxiv-congreso-de-avicultura-centroamericano-y-del-caribe/2016. Erişim tarihi: 20.05.2020.
- Jordan BJ. (2017) Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Veterinary Microbiology*, 206, 137–143.
- Jungherr EI, Chomiak TW, Luginbuhl RE. (1956) Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. Proc. 60th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Association. 203–209.
- Kahya S, Çöven F, Temelli S, Eyigör A, Çarlı KT. (2013) Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 60, 27–31.
- Ladman BS, Loupos AB, Gelb JJr. (2006) Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol.* 35:127–133.
- Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW. (2003) Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:344–348.
- Li M, Wang XY, Wei P, Chen QY, Wei ZJ, Mo ML. (2011). Serotype and genotype diversity of infectious bronchitis viruses isolated during 1985–2008 in Guangxi, China. *Arch. Virol.* 57:467.
- Li H, Wang Y, Han Z, Wang Y, Liang S, Jiang L, Hu Y, Kong X, Liu S. (2016) Recombinant duck enteritis viruses expressing major structural proteins of the infectious bronchitis virus provide protection against infectious bronchitis in chickens. *Antiviral Res.* 130, 19–26.
- Morgan RW, Gelb Jr, Schreurs J, Lutticken CS, Rosenberger D, Sondermeijer PJ. (1992) Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.* 36, 858–870.
- OIE (2018) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties, Chapter 3.3.2. World Organisation for Animal Health, Paris. Erişim adresi: <https://www.oie.int>. Erişim tarihi: 12.06.2021.
- Öngör H, Timurkaan N, Çöven F, Karabulut B, Eröksüz H, Çetinkaya B. (2021) Detection of Israel variant 2 (IS/1494/06) genotype of Infectious Bronchitis Virus in a layer chicken flock. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 68, 167–172, 2021 DOI: 10.33988/auvfd.756970.
- Pharmacopoeia. (2016) Avian Infectious Bronchitis Vaccine (live). European Pharmacopoeia, pp. 1008–1010.
- Purswell JL, Fritz BK, Branton SL, Leigh SA. (2008) Effects of system pressure and nozzle type on spray application of avian vaccines. *Appl. Eng. Agric.* 24, 785–789.
- Rautenschlein S, Hans-Christian P (2021). Infectious bronchitis: 80 years of control efforts to combat a Coronavirus infection in poultry. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* Vol. 134, No.1 DOI:10.2376/1439-0299-2020-27.
- Roh HJ, Jordan BJ, Hilt DA, Jackwood MW. (2014) Detection of infectious bronchitis virus with the use of real-time quantitative reverse transcriptase-PCR and correlation with virus detection in embryonated eggs. *Avian Dis.* 58, 398–403.
- Roh HJ, Jordan BJ, Hilt DA, Ard MB, Jackwood MW. (2015) Hatchery spray cabinet administration does not damage avian coronavirus infectious bronchitis virus vaccine based on analysis by electron microscopy and virus titration. *Avian Dis.* 9, 149–152.
- Toro H, Zhang JF, Gallardo RA, van Santen VL, van Ginkel FW, Joiner KS, Breedlove C. (2014). S1 of distinct IBV population expressed from recombinant adenovirus confers protection against challenge. *Avian Dis.* 58, 211–215.
- USDA. (1999) Title 9, Code of Federal Regulations, Standard Requirements for IBV Vaccines. Animal and Plant Health Inspection Service, USDA Section 113 p.
- Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349–364.
- Yang T, Wang HN, Wang X, Tang JN, Lu D, Zhang YF, Guo ZC, Li YL, Gao R, Kang RM. (2009) The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multi-epitope based peptide vaccines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1500–1504.
- Yang X, Zhou Y, Li J, Fu L, Ji G, Zeng F, Zhou L, Gao W, Wang H (2016). Recombinant infectious bronchitis virus (IBV) H120 vaccine strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against IBV and NDV challenge. *Arch. Virol.* 161, 1209–1216.
- Yılmaz H, Altan E, Çizmeçgil UY, Gürel A, Öztürk G, Bamac OE, Aydın Ö, Briton P, Monne I, Cetinkaya B. (2016) Phylogeny and S1 gene variation of infectious bronchitis virus detected in broilers and layers in Turkey. *Avian Dis.* 60, 596–602.
- Yin L, Zeng Y, Wang W, Wei Y, Xue C, Cao Y. (2016) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant fusion proteins containing spike protein of infectious bronchitis virus and hemagglutinin of H3N2 influenza virus in chickens. *Virus Res.* 223, 206–212.

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Numune Gönderme Klavuzu

Enstitü Müdürlüğümüze numune gönderilerken bazı aksaklıklar yaşanmakta ve bu analizlerin/testlerin geç sonuçlanmasına yada hiç sonuç alınamamasına sebep olmaktadır. Bu klavuz ile numune gönderme sırasındaki soruların bir nebze de olsa önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Numune tercih sırası: İlgili test için +: en az, ++: orta, +++: en çok tercih edilmesi gereken numunedir.

Arı Hastalıkları Laboratuvarı: Marazi maddenin nereden alındığı, arı işletmesinin veya sahibinin adı, kovan sayısı, marazi maddenin alındığı tarih, hastalığın belirtileri, hangi hastalıklardan şüphelendiği, hastalığın larva ya da ergin arı hastalığı mı olduğu, çevredeki diğer arı kolonilerinde benzeri bir hastalık ya da

ölüm olup olmadığı, toplu ölüm durumlarında çevrede tarımsal ilaçlama yapıp yapılmadığı, kış mevsimindeki ölümlerde kovan içinde yeterli besin (polen ve bal) bulunup bulunmadığı marazi madde protokolünde ayrıntılı bir şekilde belirtilmelidir.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi
Nosemosis	Ergin Arı (yaklaşık 60 adet)
Varroosis	Ergin Canlı Arı (100 adet), Larvalı Petek (10×10 cm ebadında)
Amerikan Yavru Çürüklüğü	Ergin Arı (50 adet), Bal (200 g), Larvalı Petek (en az 10 × 5 cm ebadında), Temel Petek (10 × 5 cm)
Organiklorlu, Organikfosforlu, Pretroit ve Karbamat grubu pestisitlere bağlı akut zehirlenmeler	Ölü Arı (en az 50 adet), Süzme Bal (en az 200 g), Petek (en az 200 g)

Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı: Alınan numuneler şekillen patolojik bulgulara bağlı olarak lezyonlu organ ve dokulardan steril şartlarda, 5×5 cm ebatlarında gönderilmelidir. Muayene için gönderilecek organ ve dokular: lezyonlu karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, beyin, lenf yumruları, uzun kemik, barsak, deri ile kan, süt, idrar, sperma, BOS, vücut boşluklarındaki eksudatlar, gözyaşı akıntısı, tracheal ve intrauterin svaplar ve frotilerdir. Alınan numuneler bakteriyolojik muayeneye uygun olmalı, materyal taze kadavradan alınmalıdır. En geç ölümden 2 saat sonra alınıp soğuk zincirde en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Muayene materyali en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmayacak ise

%50 steril gliserinli FTS içerisinde gönderilmelidir. Toksin analizi için gönderilen ince barsak içeriği laboratuvara aynı gün içinde ulaştırılmayacak ise 10 ml ince barsak içeriğine 1 damla kloroform ilave edilerek gönderilmelidir.

Mastitis teşhisi için hasta meme loplari içerisindeki ilk sütler ayrı bir kaba alınmalıdır. Steril şartlarda alınan 5 – 8 ml süt numunesi soğuk zincirde, en geç 24 – 48 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Gönderilecek idrar, steril şartlarda alınıp en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Laboratuvarı sağlıklı bir teşhis yapılabilmesi için antibiyotik tedavisi uygulanmadan veya uygulama yapılmışsa 15-20 gün sonra numune gönderilmelidir.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Kan	Kandan yapılan frotiler, organ	Organ (tercihen dalak)	Pamuğa emdirilmiş kan
Anthrax Hastalığının Teşhisi <i>Bacillus anthracis</i> 'in OIE standartlarına göre izolasyon ve identifikasyonu.	+++	+++	+	+++

Test Adı / Test Yöntemi	Kanatlı boyun, kanat	<i>Salmonella</i> spp. düzeyinde kültürlerden	Drug Swap	Gaita	Svap
<i>Salmonella</i> spp./ İzolasyon / Kültür	+++		+++	+++	+++
<i>Salmonella</i> Serotiplendirme "ISO 6579:2017-02"		+++			

Test Adı / Test Yöntemi	Yem Numunesi	Rumen İçeriği	Kan Serumu
<i>C. botulinum</i> Toksinlerinin Tespiti	+++	+++	+

Biyokimya Laboratuvarı : Serum örnekleri, en az 2 ml olmalı, kanla karışık veya hemolizli olmamalıdır. Serumun konduğu tüplerin üzerinde hayvana ait bilgilerin (Kulak numarası veya adı vs.) bulunduğu etiket yapıştırılmış olmalıdır. Serum soğuk zincirde uygun bir ambalaj içerisinde gönderilmelidir.

Gönderilen yemler usulüne uygun bir şekilde alınıp, temiz naylon torba içerisinde (100-1000 g) ve kendine ait bilgiler açıklanarak gönderilmelidir.

Doku örneği (kalp, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, kas vb.), koruyucu bir madde konmaksızın dondurularak, üzeri etiketlenmiş

naylon torba veya kavanozda (en az 50g.) soğuk zincir içerisinde gönderilmelidir.

Balıklar koruyucu bir madde konmaksızın dondurularak, üzeri etiketlenmiş naylon torba veya kavanozda (en az 100g) soğuk zincir içerisinde gönderilmelidir. Gıda ve gıda katkı maddelerinin kendine has muhafaza edildiği veya tüketime sunulduğu orijinal ambalajı ile birlikte (100-1000 g / 100-1000 ml) ilave hiçbir konservatif madde konulmaksızın soğuk zincir ile gönderilmelidir.

Tüm numuneler buzdolabı koşullarında (4°C) saklanarak, herhangi bir kimyasal eklenmeden (FTS, formol, alkol vb.) soğuk zincirde gönderilmelidir.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi		
	Kan Serumu	Doku/Organ	Hayvansal Gıda, Su
Serum biyokimyasal analizleri / Spektrofotometrik metot	+++		
Ağır metal tayini (Pb, Cd, As, Hg vb.) / ICP-MS	+++	+++	+++
Kan serumunda makro ve iz element tayini (Ca, Mg, Na, K, Cu, Zn, Fe vb.) Spektrofotometrik ve ICP-MS	+++		

Genetik laboratuvarı: Laboratuvarımıza DNA analizi için at, sığır ve koyunlardan kan, kıl ve sperma örnekleri gönderilecektir. Numune saklama ve gönderme: Tüm numuneler buzdolabı koşullarında (+4°C) muhafaza edilerek; kanlar EDTA'lı ya da Lityum He-

parin'li tüplerde, kıllar köklü olarak en az 25-30 adet boş ve steril tüp ya da zarf içerisinde, dondurulmuş spermalar tohumlama payetlerinde, taze sperma da steril tüp içerisinde gönderilmelidir.

Test Adı / Test Tipi / Tür	Numune Tipi		
	Antikoagulanlı Kan (EDTA ya da Lityum Heparin)	Kıl (Köklü)	Sperma
DNA-STR/ Mikrosatellite Analizi / At	+++	++	++
DNA-STR/ Mikrosatellite Analizi / Sığır	++	+	+++
DNA-STR/ Mikrosatellite Analizi / Koyun	+++	+	+++

Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi				
	Kan Serumu	Kloakal Swap	Tracheal Swap	Drag Swap	Kadavra
Avian Influenza /Antikor / ELİSA	+++				
Avian Influenza / Antijen / Hızlı Test / matris proteinin tanımlanması / RT-qPCR / H (H5, H7 ve H9) tiplendirilmesi/ RT/ q PCR/ H tiplendirilmesi / HI/ETY Virus izolasyonu / Avian Influenza'nın Patojenite Tespiti / DNA dizileme analizi / IVPI (Intra Venöz Patojenite İndeks) / Avian Influenza N (N1-9) Proteinin tespiti / q PCR		+++	+++		+++
Avian Encephalomyelitis (AE)/Antikor/ ELİSA	+++				
Chicken Anemia Agent (CAV) / Antikor	+++				
Avian Leukosis Virus (AL) / Antikor	+++				
Avian Reovirus / Antikor	+++				
Infectious bronchitis (IB)/Antijen/ Nested RT- PCR		++	++		+++
Infectious bronchitis (IB) / Antikor/ ELİSA	+++				
Infectious Bursal Disease (IBD)/ Antijen/ RT- q PCR		+++	+++		+++
Infectious Bursal Disease (IBD) / Antikor/ ELİSA	+++				
Gumboro / AGP Testi / ELİSA	+++				
Marek Hastalığı/ Antijen/ q PCR		+++	+++		+++
Infectious laryngotracheitis (ILT)/ Antijen/ RT- qPCR		+++	+++		+++
Infectious laryngotracheitis (ILT)/ Antikor/ ELİSA	+++				
Newcastle (ND)/ ETY Virus İzolasyonu / HA, HI		+++	+++		+++
Newcastle (ND)/ Antikor / HI/ ELİSA	+++				
Newcastle (ND)/ Antijen/ RT- qPCR/ RT-PCR / patojenite tespiti/ICPI		+++	+++		+++
Newcastlenin Serotiplendirilmesi/HI	+++				
Newcastle Hastalığı Virüsü Fusion Genin Tanımlanması/q PCR / patojenite tespiti/ DNA dizileme analizi		+++	+++		+++
Derzy Hastalığı/ Antijen/ PCR/ qPCR		+++	+++		+++
CRD (chronic respiratory disease) Mikoplazma galliseptikum/izolasyon, identifikasyon		+++	+++		+++
CRD (chronic respiratory disease) Mikoplazma galliseptikum/ Antikor/ HA/HI / ELİSA	+++				
CRD (chronic respiratory disease) Mikoplazma galliseptikum/Antijen / PCR / q PCR		+	+++ Burun Boşluğu, Sinus, Hava Kesesi Svabları		+++
İnfeksiyöz Sinovitis/ İzolasyon, identifikasyon			+++		+++
İnfeksiyöz Sinovitis/ antikor/ HA/HI / ELİSA	+++				
İnfeksiyöz Sinovitis/ antijen/ PCR / q PCR			+++ Eklem Sıvısı		+++
M. Meleagridis/ İzolasyon, identifikasyon			+++		+++
M. Meleagridis/ antikor/ HA	+++				
Salmonellalarda ISO 6579'a göre izolasyon		++		+++	+++
Salmonella (Tifo) / Pullorum / İzolasyon, identifikasyon		+++		+++	+++
Salmonella (Tifo)/ Pullorum / antikor/ HA	+++				
Swollen Head Syndrome (SHS)/Turkey Rhinotracheitis (TRT)/Antikor	+++				
İnfeksiyöz Koriza/izolasyon, identifikasyon		+++	+++ Sinus içeriği, Trachea, Burun Boşluğu, Hava Kesesi Svabları		+++
İnfeksiyöz Koriza/q PCR		+++			
İnfeksiyöz Koriza/antikor/ HA	+++				
Kanatlı Kolerası/izolasyon, identifikasyon		+++	+++		+++
Kanatlı Kolerası/antikor/ HI	+++				

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi				
	Kan Serumu	Kloakal Svap	Tracheal Svap	Drag Svap	Kadavra
Kolibasillozis/ İzolasyon, identifikasyon		+++	+++	+++	+++
Avian Campylobacteriosis izolasyon/identifikasyon		+++ Sekum İçeriği			
Avian tüberküloz/izolasyon					+++
Avian Adenovirus enfeksiyonları/ q PCR TESPİTİ					+++

*Marek Hastalığı için numune olarak tüy gönderilebilir.

Damızlık Sağlık Sertifikası

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi						
	Kan Serumu	Kloakal Svap	Tracheal Svap	Drag Svap	Besi Yeri (Kanlı Agar)	Besi Yeri (Mc Conkey)	Besi Yeri (SDA Agar)
<i>S. Pullorum</i> / <i>S.Enteritidis</i> / <i>S. Gallinarum</i> / <i>S.Thyphimurium</i> İzolasyon, İdentifikasyon		+++		+++			
<i>M.Gallicepticum</i> / <i>M.Meleagridis</i> / İzolasyon, İdentifikasyon			+++				
<i>M.Gallicepticum</i> / <i>M.Meleagridis</i> /Antikor/HA	+++						
Total Bakteri Sayımı					+++	+++	
Total Mantar Sayımı							+++

Kuluçkahane Sağlık Sertifikası

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi						
	Civciv	Embriyolu Yumurta	Yumurta Kabuğu	Çevresel Svap	Besi Yeri (Kanlı Agar)	Besi Yeri (Mc Conkey)	Besi Yeri (SDA Agar)
<i>S. Pullorum</i> / <i>S. Gallinarum</i> / <i>S. Enteritidis</i> / İzolasyon, İdentifikasyon	+++	+++	+++	+++			
<i>M.Gallicepticum</i> / <i>M.Meleagridis</i> İzolasyon, İdentifikasyon	+++						
Total Bakteri Sayımı					+++	+++	
Total Mantar Sayımı							+++

Kuduz Teşhis Laboratuvarı: FAT, PCR, RTCIT testleri için gönderilecek Beyin- Beyincik miktarı en az 10 g olmalıdır. Kadavra numuneleri sadece kedi, küçük köpek ırkları ve ağırlığı 5 kg geçmeyen küçük vücutlu hayvanlar için geçerlidir. Çift -Tek tırnaklı havanlar için kadavra numunesi kabul edilememektedir. Bu hayvanlarda

kafa ya da beyin-beyincik numunesi soğuk zincirde gönderilmelidir.

FAVN testi için en az 2 ml Serum soğuk zincirde gönderilmelidir (Kan, boş kan tüplerine alınıp, serumu ayırdıktan sonra, serum eppendorf tüpe aktararak gönderilmelidir).

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Beyin-Beyincik	Kafa	Kadavra	Kan Serumu
Kuduz - FAT (Florasan Antikor Testi), Real Time RT-PCR, RT – PCR/ RTCIT (Kuduz Doku Kültürü Enfeksiyon Testi)	+++	++	+	
Kuduz - FAVN (Florasan Antikor Virus Nötralisasyon) Testi				+++

Parazitoloji Laboratuvarı: İç organ numunelerinde hastalık semptomlarının görüldüğü sisteme ait numune gönderilmelidir. Örneğin, sindirim sistemini etkileyen bir hastalık var ise bağırsak numunesi (bazı durumlarda mide ile birlikte), solunum sistemini etkileyen bir hastalık var ise parazitlerin gelişim evrelerinin görülebileceği bağırsağın yanında hastalık semptomlarının görüldüğü akciğer numunesi de gönderilmelidir. Gaita gönderilecekse toprakla kontamine olmadan alınarak gönderilmelidir. Sistemik hastalıklar veya hastalık sebebinin bilinmediği durumlarda akciğer, karaciğer, dalak, bağırsak gibi organlar birlikte gönderilebilir. La-

boratuvarımızda sığır, koyun-keçi gibi ruminantların kan protozoonlarının teşhisi tam kandan yapılmakta olup kan serumlarından teşhis yapılamamaktadır (eğer kan ulaştırılamıyorsa dalak veya karaciğer dokuları gönderilebilir). Preputial / Vaginal yıkantıların alınma tarihi ve saati numune üzerine yazılmalı ve zaman kaybetmeden 24 saat içinde laboratuvarımıza ulaştırılmalıdır.

Organ numuneleri buzdolabı koşullarında (4°C) saklanarak, herhangi bir kimyasal eklenmeden (FTS, formol, alkol vb.) mümkün olan en kısa sürede soğuk zincirde laboratuvarımıza ulaştırılmalıdır.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi
Dourine (<i>Trypanosoma equiperdum</i>) / CFT	Kan serumu
<i>Babesia caballi</i> ve <i>Babesia (Theileria) equi</i> / c-ELISA/ IFAT	Kan serumu
<i>Trichomonas foetus</i> / Kültür(Yıkantılar Laktatlı Ringer Solüsyonu ile alınmalıdır.)	Preputial / Vaginal Yıkantı
Toksoplazmosis / c-ELISA	Kan serumu
<i>Ehrlichia canis</i> / Canine Leishmaniasis / IFAT	Kan serumu
Gaita Ve Organda Natif Muayene	İç organ örnekleri, gaita
Protozoonların Fikzasyonu, Boyanması ve İdentifikasyonu	Antikoagülanlı kan, kan frotisi veya organ frotisi
Trichinella Teşhisi	Kas dokusu
Artropod Cins / Tür Tanımlaması	Bütünlüğü bozulmamış Artropod
Uyuz Muayenesi**	Deri kazıntısı, lezyonlu bölgeden kıl folikülü

Patoloji Laboratuvarı: Organ numunelerinde hastalık görüldüğü sisteme ait numune gönderilecektir. Örneğin, solunum sistemini etkileyen bir hastalık var ise akciğer numunesi gönderilmelidir. Hayvanlarda ishal var ise bağırsak mutlaka gönderilmelidir. Sistemik hastalıklar ve bilinmeyen durumlarda Akciğer, Karaciğer, Dalak, Bağırsak, Böbrek, koyun ve keçi türlerinden Dil, Dudak alınacaktır. Sinir sistemi ile ilgili bulgulara Beyin alınacaktır. Numune saklama ve gönderme: Tüm numuneler buzdolabı koşullarında

(4°C) soğuk zincirde gönderilmelidir. Sadece patolojik analiz istenilirse %10'luk formol yada %70 lik alkol içerisinde gönderilebilir. Kokuşmuş yani otoliz olmuş dokulardan patolojik inceleme yapılamamaktadır. Sağlıklı sonuç alınması için organların eksiksiz ve anamnez bulguları yönlendirici şekilde ayrıntılı olarak yazılmalıdır. Hayvana ait ölüm zamanı doğru olarak tespit edilmelidir ve analiz istek yazısında belirtilmelidir. Kedi köpek hastalıklarında ishal ile seyreden hastalıklarda bağırsak ve mide tüm olarak alınmalıdır.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi	
	Organlar	
Koyun Keçi Çiçeği / Koyun Keçi Vebası (PPR) H×E Boyama yöntemi	Akciğer, Deri, Dil, Dudak, Tonsil	
Ektima / H×E Boyama yöntemi	Akciğer, Dil, Dudak,	
Lumpy Skin Disease (LSD) (Sığırların nodüler ekzantemi)/ H×E Boyama yöntemi	Akciğer, Deri,	
Siğir Tüberkülozisi H×E Boyama yöntemi/ Ziehl Nelsen Boyama	Akciğer, Lenf yumrusu, lezyonlu organlar,	
Beyaz kas hastalığı H×E Boyama yöntemi	Kalp, Çizgili kas doku	
Ketozis/Gebelik toksemisi / H×E Boyama yöntemi	Karaciğer	
Scrapie /FSE /BSE, / H×E Boyama yöntemi / Elisa / Immunperoksidaz	Beyin, (OBEX kısmı)	
Listeriozis / H×E Boyama yöntemi	Beyin,	
Şap hastalığı / H×E Boyama yöntemi	Tüm olarak kalp, Dil, Dudak, Meme epitel Dokusu	
Kedi köpek hastalıklarında / H×E Boyama yöntemi	Akciğer, Karaciğer, Mide, Bağırsak, Kalp, Dalak, Böbrek, Beyin (Organlar tüm olarak)	
Bakır Toksikasyonu	Böbrek, Karaciğer,	

Spiroket Hastalıkları Leptospirozis teşhisi için kan serumu ile çalışılmaktadır.

Toksikoloji Laboratuvarı Şüpheli hayvan ölümlerinin aydınlatılmasına yönelik toksikolojik muayene analizlerinde (pestisit kaynaklı akut zehirlenme vakaları); postmortem olarak nekropsisi yapılmış hayvanların iç organ (karaciğer) ve doku örnekleri (kas dokusu) ile mide-bağırsak içerikleri, yem, su ve varsa etrafındaki şüpheli materyal (et parçası vb.) gönderilmelidir. Ayrıca *Kanatlı hayvanlarda kursak, taşlık ve bezli mide, *ölü balıklar ortamdaki suyu ile birlikte ve *ölü arılar ise en az 50 adet olacak şekilde varsa bal /peteği ile birlikte gönderilmelidir. Pestisit grubu kalıntı analizlerinde; hayvansal orijinli gıda maddeleri(kas dokusu, yumurta, çiğ süt, bal, balık) ile anabolik madde kalıntı analizlerinde kas dokusu ve büyükbaş hayvana ait idrar numuneleri Ulusal Kalıntı İzleme Planında (UKİP) belirtilen esaslara uygun miktarlarda ve

numune alma etiketlerinde istenilen tüm bilgiler eksiksiz yazılarak gönderilmelidir.

Tüberküloz, Paratüberküloz Ve Ruam Teşhis Laboratuvarı

Tüberküloz: Bakteriyoloji ve PCR için: Nekropsi Yapılan Hayvanlardan; Solunum sistemi lenf bezleri (Mediastinal, Bronşiyal, Retrofaringeal), lezyonlu akciğer ve karaciğer dokuları, sindirim sistemi lenf bezleri ile tüberküloza özgü diğer makroskopik lezyonlu bölgeler dikkatlice belirlenerek buralardan örnek alınmalıdır. Gamma Interferon Testi İçin: Bu test için en az 10 ml antikoagulanlı (lityum heparinli) kan örneği alınarak oda ısısında (+22°C) en geç 8-12 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Paratüberküloz: Bakteriyolojik ve PCR Muayeneleri İçin: Nekropsi Yapılan Hayvanlardan: Bağırsakların bütünü kontrol edilerek kalınlaşmış bölümlerden birkaç parça ve bölgesel lenf bezleri (mezenenteriyal ve iliosekal) ni içeren doku örnekleri alınmalıdır.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Kan Serumu	Antikoagulanlı Kan (Lithium Heparinli)	Organ*	Svap*
Paratüberküloz / Tüberküloz/Antikor/ ELISA	+++			
Paratüberküloz / Tüberküloz/Antijen/ RT-PCR / Bakteriyolojik Muayene			+++	
Tüberküloz/ Gamma-IFN ELISA		+++		
Ruam CFT	+++			

Virolojik Teşhis Laboratuvarı

* Organ ve Svap numunelerinde hastalık semptomlarının görüldüğü sisteme ait numune gönderilecektir. Örneğin, solunum sistemini etkileyen bir hastalık var ise ağız ve burundan svap veya hayvan ölü ise akciğer numunesi gönderilmelidir. Hayvanlarda ishal var ise rektal svap veya dışkı; ağız burun akıntıları var ise

ağız ve burundan svap örneği gönderilmelidir. Sistemik hastalıklar ve bilinmeyen durumlarda Akciğer, Karaciğer, Dalak, Bağırsak, Böbrek alınacaktır. Sinir sistemi ile ilgili bulgulara Beyin de alınacaktır. Numune saklama ve gönderme: Tüm numuneler buzdolabı koşullarında (4°C) saklanarak, herhangi bir kimyasal eklenmeden (FTS, formol, alkol vb.) soğuk zincirde gönderilmelidir.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Kan Serumu	Antikoagulanlı Kan (EDTA'lı)	Organ*	Svap*
Akabane /Antikor/ ELISA	+			
Akabane /Antijen/ qRT-PCR		++	+++	+
Border Disease Virus (BDV) /Antijen/ Antikor/ ELISA	+			
Border Disease Virus (BDV) /Antijen/ qRT-PCR	+	++	+++	++
Bovine ephemeral fever (BEF) /Antikor/ ELISA	+			
Bovine ephemeral fever (BEF) /Antijen/ qRT-PCR		++	++	+

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Kan Serumu	Antikoagulanlı Kan (EDTA'lı)	Organ*	Swap*
Bovine Herpes Virus 1 (BHV -1) /Antijen/ ELISA			+	
Bovine Parainfluenza-3 (PI-3) /Antijen/ ELISA			(Akciğer)	
Bovine Viral Diarrhoea (BVD) /Antijen/ ELISA				
Bovine Respiratory Synstal Virus (BRSV)/ Antijen/ ELISA				
Bovine Parainfluenza-3 (PI-3) /Antikor/ ELISA	+			
Bovine Viral Diarrhoea (BVD) /Antijen/ qRT-PCR		++	++	+
Bovine Viral Diarrhoea (BVD) /Antijen/ ELISA	++	+		
Bovine Viral Diarrhoea (BVD) /Antikor/ ELISA	+			
Caprine Arthritis Encephalitis Virus / Maedi-visna (CAEV/MV) /Antikor/ ELISA	+			
Coronavirus /Antijen/ ELISA			+++	+
Rotavirus /Antijen/ ELISA			(Bağırsak)	(Rektal)
Ektima /Antijen/ qRT-PCR		+	+++	++
Enzootik Bovine Leukosis (EBL) /Antikor/ ELISA	+			
Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD) /Antikor/ ELISA	+			
Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD) /Antijen/ qRT-PCR		++	+++	+
IBR gB/ gE /Antikor/ ELISA/ Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) (Bovine Herpes Virus 1, BHV-1) /Antikor/ ELISA	+			
Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR, BHV-1) /Antijen/ qPCR		+	+++	++
Koyun Keçi Çiçeği /Antijen/ qPCR	+	+	++	+++ (Lezyon kazıntısı)
Koyun Keçi Vebası (PPR) /Antikor/ ELISA	+			
Koyun Keçi Vebası (PPR) /Antijen/ qRT-PCR		+	+++	++
Lumpy Skin Disease (LSD) (Siğirılarda nodüler ekzantemi) /Antijen/ qPCR	+	++	++	+++ (Lezyon kazıntısı)
Malignant Catarrhal Fever (MCF) (Coryza gangrenosa bovum) /Antijen/ qPCR		+	+++	++
Mavi Dil Virüsü (BT) /Antikor/ ELISA	+			
Mavi Dil Virüsü (BT) (Bluetongue Virus) /Antijen/ qRT-PCR		+++	++	+
Schmallenberg Virus (SBV) /Antikor/ ELISA	+			
Schmallenberg Virus (SBV) /Antijen/ qRT-PCR		+	+++	++
African horse sickness (AHS) (Afrika At Vebası) /Antikor/ ELISA	+			
African horse sickness (AHS) (Afrika At Vebası) /Antijen/ qRT-PCR		++	++	+
Batı Nil Virüsü (BNV) (West Nile Virus, WNV) /Antikor/ ELISA	+			
Batı Nil Virüsü (BNV) /Antijen/ qRT-PCR		++	+++	+
Batı Nil Virüsü (BNV)/ IgM /Antikor/ ELISA	+			
Equine Herpes Virus 1-4 (EHV 1-4) /Antikor/ ELISA	+			
Equine Herpes Virus 1-4 (EHV 1-4) /Antijen/ qPCR		+	++	+++ (Vajinal, Nasal)
Equine Herpes Virus 3 (EHV 3)/Antijen/ qPCR		+	++	+++ (Lezyonlardan)
Equine Influenza Virus (EIV) /Equine Infectious Anemia (EIA) /Antikor/ ELISA/ AGID	+			
Equine influenza virus (EIV) /Antijen/ qRT-PCR		+	++	+++ (Tracheal, Nasal)
Equine Viral Arteritis (EVA) /Antikor/ Virus Nötralizasyon	+			
EVA /Antijen/ qRT-PCR		+	+++	++
SARS CoV-2 (COVID-19)		+	++	+++ (Nasal, Oral, rektal)
SARS CoV-2 (COVID-19) Nötralizasyon Testi	+			

Yetiştirme Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı: Numune saklama ve gönderme: Tüm numuneler buzdolabı koşullarında (4°C) saklanarak, her hangi bir kimyasal eklenmeden (FTS, formol, alkol vb.) veya %50 gliserinli steril FTS ile soğuk zincirde gönderilmelidir.

CEM yönünden analiz isteniyorsa kömürlü swap kullanılmalıdır. Prepusyum Yıkantısı veya Suni Vagen Yıkantısı Steril pH'sı 7.2 olan PBS içinde gönderilmelidir. Organ: fetal iç organ, mide içeriği.

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Kan Serumu	Yıkantı (Preputial/Vaginal)	Organ*	Swap*
<i>Salmonella</i> spp./ <i>Campylobacter</i> spp./ <i>Brusella</i> spp./ İzolasyon / Kültür			+++	+++
Bovine Venereal Campylobacteriosis / İzolasyon / Kültür		+++		
Brusella / Antikor / Rose Bengal Plate Test (RBPT) / Serum Aglutinasyon Test (SAT) / Complement Fiksasyon Test (CFT)	+++			

Test Adı / Test Yöntemi	Numune Tipi			
	Kan Serumu	Antikoagulanlı Kan (EDTA'lı)	Organ*	Swap*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Klebsiella pneumonia</i> / <i>Taylorella equigenitalis</i> (Contagios Equine Metritis) / İzolasyon / Kültür				+++
Salmonella abortus equi / antikor / Tüp Aglutinasyon Test	+++			