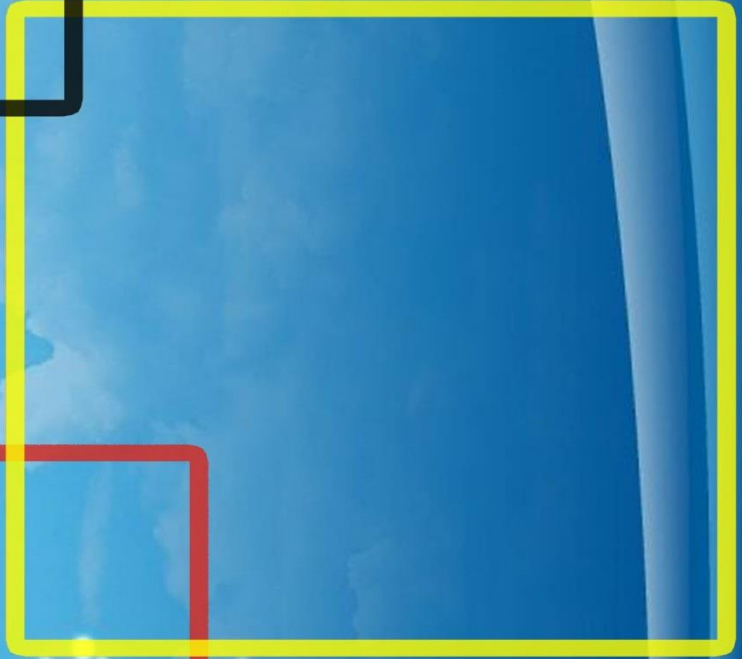




# VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2020 / Volume: 31 / Issue: 3

ISSN : 2149-3359  
e-ISSN : 2149-8644





November - 2020



# VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Van Yuzuncu Yil Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

## Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

## Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT

Van YU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu

Kampus / Van - Turkey

Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27

e-mail: vfd@yyu.edu.tr

## Editors (Editorial Board)

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)

Prof. Dr. Handan MERT (Proof Reading Editor)

Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)

Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Section Editor)

Assist. Prof. Dr. Ornampai JAPA (Section Editor)

Assoc. Prof. Dr. Leyla MIS (Technical Editor)

Assoc. Prof. Dr. Bekir OGUZ (Electronic Journal Editor)

Assoc. Prof. Dr. Abdullah KARASU (Section Editor)

Prof. Dr. Omar ATROOZ (Section Editor)

Assist. Prof. Dr. Rabia Mehtap TUNCAY (Section Editor)

Assoc. Prof. Dr. Cristian MAGDAS (Section Editor)

## Publication Board

Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Ali CINAR (Univ. of Ataturk)

Prof. Dr. Abeer F. El Nahas (Alexandria, EGYPT)

Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)

Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)

Prof. Dr. Berrin SALMANOGLU (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Cumali OZKAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Devrim S. AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Ehab Abu-Basha (Irbid, JORDAN)

Prof. Dr. Gert W NIEBAUER (Vienna, Austria)

Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif Ersoy)

Prof. Dr. Hasan Huseyin HADIMLI (Univ. of Selcuk)

Prof. Dr. James M. MAY (Nashville, TN, USA)

Prof. Dr. Kamil EKICI (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Logman ASLAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Nalan OZDAL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Oguz SARIMEHMETOGLU (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Tevhide SEL (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Ufuk Tansel SIRELI (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Volkan AKYOL (Univ. of Uludag)

Prof. Dr. Tugba BINGOL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Yeter DEGER (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Bahattin CAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Feraye Esen GURSEL (Univ. of Istanbul-Cerrahpasa)

Assoc. Prof. Dr. Hasan Huseyin ARI (Univ. of Cumhuriyet)

Assoc. Prof. Dr. Yildiray BASBUGAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Ali Rıza BABA OGLU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

## Scientific Board of This Issue

Assist. Prof. Dr. Ulas ACAR OZ (Univ of Afyon Kocatepe)

Assist. Prof. Dr. Tuncer CAKMAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Ebru CETIN (Univ. of Erciyes)

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK (Univ of Dicle)

Res. Assist. Dr. Fusun ERHAN (Univ. of Cumhuriyet)

Assoc. Prof. Dr. Sami GOKPINAR (Univ of Kirikkale)

Assist. Prof. Dr. Burcak GURBUZ (Univ. of Marmara)

Assoc. Prof. Dr. Metin GURCAY (Univ of Bingol)

Assist. Prof. Dr. Emin KARAKURT (Univ of Kafkas)

Assoc. Prof. Dr. Ahmet KOC (Univ. of Uludag)

Prof. Dr. Süleyman KOZAT (Univ of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Caner KAYIKCI (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Mehmet SAGLAM (Univ. of Aksaray)

Prof. Dr. Cumali OZKAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Mahmut ULGER (Univ. of Mersin)

Prof. Dr. Kerem URAL (Univ of Adnan Menderes)

Prof. Dr. Armagan Erdem UTUK (Univ of Cukurova)

Assoc. Prof. Dr. Turan YAMAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Nazmi YUKSEK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

This journal is published three times a year. Journal Title Abbreviation: **Van Vet J**

All articles in this journal are available free of charge from <http://dergipark.gov.tr/vanveti>

Year	Volume	Issue
2020	31	3

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, Chemical Abstract, Asos Index, ROOT INDEXING, J-Gate, COSMOS IF, DRJI, ResearchBib, Turkiye Atif Dizini and Google Scholar

Original Articles

- **Yalçın H, Can PÖ.** Dondurularak Satılan Kalamarların (*Todarodes pacificus*) Mikrobiyal Kalitesi (Microbial Quality of Frozen Retail Squid (*Todarodes pacificus*)) **117-121**
- **İnce ÖB.** Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection Epidemiology at Dairies in the Province of Afyonkarahisar (Afyonkarahisar İli Süt Sığırı İşletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Epidemiyolojik Araştırılması) **122-126**
- **Goncagül G, Güceyü Ç, Günaydın E.** *Cotinus coggygia* Scop. (Tetra) Bitkisinin Etanol Ekstraktının Antibakteriyel Aktivitesinin In Vitro Araştırılması (Investigation of In-Vitro Antibacterial Activity of *Cotinus coggygia* Scop. Extracts) **127-132**
- **Akyüz E, Kırmızıgül AH, Kuru M, Sezer M, Gökdemir T, Batı YU, Naseri A, Gökçe G.** Evaluation of Some Clinical, Hematological and Biochemical Parameters in Healthy Gurcu Bucks and Does (Sağlıklı Gürcü Teke ve Keçilerinde Bazı Klinik, Hematolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi) **133-138**
- **Uslu S, Yörük M.** Ratlarda Tekrarlayan Dozlarda GnRH uygulamasının, Östrojen  $\alpha$  ve Progesteron B Reseptörlerine Etkisinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması (Immunohistochemically Investigation of the Effect of Repeated Doses of GnRH on Oestrogen  $\alpha$  and Progesterone B Receptors in Rats) **139-144**
- **Sancak T, Alkan İ.** İkinci Derece Yanık Yaralarının Sağaltımında Enjekte Edilebilen Trombositten Zengin Fibrin Kullanımının Termografik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi: Tavşan Modeli (Thermographic and Histopathological Evaluation of Injectable Platelet Rich Fibrin On Treatment Of Second Degree Burn Wounds: Rabbit Model) **145-151**
- **Bhowmik M, Hossen MA, Mamun MAA, Hasib FMY, Poddar S, Hossain MA, Alim MA.** Prevalence of Gastrointestinal Parasitic Infections in Sheep and Goats of Sandwip Island, Chattogram, Bangladesh (Bangladeş, Chattogram, Sandwip Adası'ndaki Koyun ve Keçilerde Gastrointestinal Parazit Enfeksiyonlarının Prevalansı) **152-157**

Review



- **Bilgic B, Bayrakal A, Dokuzeylül B, Dodurka T, Or ME.** Zoonotic Importance of *Giardia* spp. Infections in Asymptomatic Dogs (Asemptomatik Köpeklerde *Giardia* spp. Enfeksiyonlarının Zoonotik Önemi) **158-160**

Case Report

- **Atasever A, Ekebaş G.** A Case of Duodenal and Pancreatic Agenesis in A Calf (Bir Buzağıda Duodenum ve Pankreatik Agenesis Olgusu) **161-163**



## Microbial Quality of Frozen Retail Squid (*Todarodes pacificus*)

Halil YALÇIN<sup>1</sup>  Özlem Pelin CAN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Burdur, Turkey

<sup>2</sup> Cumhuriyet University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Sivas, Turkey

Received: 24.09.2019

Accepted: 08.05.2020

### ABSTRACT

In this study, cleaned and frozen squid (*Todarodes pacificus*) samples were examined for *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *L. monocytogenes* and coagulase (+) *S. aureus*. One hundred ring-shaped squid samples, which were frozen in styrofoam plates, were collected from different sale points and brought to the laboratory under the cold chain. Each styrofoam dish containing approximately 500 g of ring squids in 6-8 cm diameter was regarded as one sample. In the study, 7 samples of *E. coli* (7%), 10 samples of *Pseudomonas* spp. (10%), 8 samples of coagulase (+) *S. aureus* (8%) and 5 samples of *L. monocytogenes* (5%) were determined in all samples examined. The highest number of *E. coli*, *Pseudomonas* spp. and coagulase (+) *S. aureus* in squid samples were  $4.7 \times 10^3$  cfu/g,  $7.0 \times 10^2$  cfu/g and  $8.9 \times 10^2$  cfu/g, respectively. Results indicate that, some of the squid samples were contaminated with bacteria that would endanger public health. It has been showed that microbiological controls of squid sold in the market should be performed frequently and precautions should be taken to prevent contamination during production.

**Keywords:** Squid, Microbial Quality, Hygiene, Public Health, *S. aureus*

### ÖZ

### Dondurularak Satılan Kalamarların (*Todarodes pacificus*) Mikrobiyal Kalitesi

Bu çalışmada, temizlenmiş ve dondurulmuş kalamar (*Todarodes pacificus*) örnekleri *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *L. monocytogenes* ve koagülaz (+) *S. aureus* açısından incelenmiştir. Halka şekli verilen ve strafor tabaklarda dondurularak satılan 100 adet kalamar örneği farklı satış noktalarından toplanarak, soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Yaklaşık olarak 500 g ağırlığında ve içerisinde 6-8 cm çapında halka kalamar bulunan her strafor tabak bir örnek olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada incelenen örneklerin 7'sinde (%7) *E. coli*, 10'unda (%10) *Pseudomonas* spp., 8'inde (%8) koagülaz (+) *S. aureus* ve 5'inde (%5) *L. monocytogenes* tespit edilmiştir. Kalamar örneklerinde en yüksek *E. coli*, *Pseudomonas* spp. ve koagülaz (+) *S. aureus* sayısı sırasıyla,  $4.7 \times 10^3$  kob/g,  $7.0 \times 10^2$  kob/g ve  $8.9 \times 10^2$  kob/g olarak tespit edilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, kalamar örneklerinin bir kısmının halk sağlığını tehlikeye sokacak bakterilerle kontamine olduğu belirlenmiştir. Piyasada satılan kalamarların mikrobiyolojik kontrollerinin sıklıkla yapılması ve üretim sırasında kontaminasyonun önüne geçecek tedbirlerin alınması gerektiği ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Kalamar, Mikrobiyal Kalite, Hijyen, Halk Sağlığı, *S. aureus*

### GİRİŞ

Su ürünleri, insanların sağlıklı beslenmesi açısından gerekli bileşenleri istenilen düzeyde bulundurmaları yanı sıra iyi bir protein (%13.0-19.2) kaynağıdır (Deng ve ark. 2012). Kalamarlar, *Cephalopoda* sınıfından olup *Teuthoidea* takımında yer alan ülkemiz sularında önemli bir potansiyele sahip yumuşakçalardır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre kalamar üretimimiz 523 ton (TÜİK 2019). Diğer kafadan bacaklılarda olduğu gibi, kalamarların da manto ve kolları yenmektedir. Isıl işlem uygulanarak hazırlanmasının yanında çiğ ve yarı kuru halde de tüketilmektedir. Avcılığın yoğun yapıldığı dönemlerde elde edilen deniz ürünleri sonraki süreçlerde satılmak için donmuş olarak depolanmaktadır (Deng ve

ark. 2012). Bakteriyel, viral, paraziter ya da kimyasal faktörlerle gıdaların kontamine olmasıyla insanlarda ortaya çıkan hastalıklar dünyada geniş bir yelpaze içinde yer almaktadır (Teplitski ve ark. 2009). Taze kalamar %80'den fazla su içerdiğinden mikrobiyal faaliyete oldukça uygundur ayrıca işlenmesinde elle müdahale olduğundan patojen bakterilerce kontaminasyonu büyük risk teşkil etmektedir (Choi ve ark. 2012). Gıda sanayiinin gıda güvenliği konusunda ilerlemesine ve bilinçli tüketici kitlesinin oluşmasına rağmen deniz ürünlerinde *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve patojenik vibrio türleri gibi bakteriler tespit edilmektedir (EFSA 2010; Beleneva 2011). Buna sebep olarak, gıdaların daha az işlenmesi ile ilgili taleplerin artması, global pazarların oluşması, uzun nakliye



ihtiyaçları, soğuk zincirin kırılması, patojen bakterilerin varlığına ve çoğalmasına sebep olacak yeni faktörlerin (antibiyotik kullanımı vs.) şekillenmesi gösterilmektedir (Rendueles ve ark. 2011; Vázquez-Sánchez ve ark. 2012). Su ürünleri, kaynağında ya da taşıma ve işleme sırasında birçok mikroorganizmayla kontamine olabilir. Önemli bir hijyen faktörü olan *E. coli* bağırsak kökenlidir. Bu bakterinin gıdalarda varlığı işleme sırasında yetersiz hijyeni veya işlem sonrasında çapraz bulaşmayı gösterir. Deniz ürünleri, insan listeriozisinin ve stafilokokkal infeksiyonlarının sebeplerinden biri olarak görülmektedir (Liston 1990; Rocourt ve Cossart 1997). İnsan eliyle yetiştirilmekte olan kültür balıklarının %80'nin *L. monocytogenes* ile kontamine olabileceği belirtilmiştir (Fenlon 1999). Araştırmacılar tarafından deniz suyu ve deniz canlılarında *L. monocytogenes*'in çoklu direnç gösteren suşlarının varlığı rapor edilmiştir (Rodas-Suárez ve ark. 2006).

*S. aureus* dünya genelinde insanlarda gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan bakterilerin başında gelmektedir (EFSA 2010; Bogdanovicova ve ark. 2017). Güney Kore'de kurutulmuş kalamarlarda *S. aureus* (1.00 log kob/g) ve koliform (0.90 log kob/g) bakterileri tespit edilmiş ve bunların kaynağının ham madde ve hijyen kurallarına dikkat edilmeden yapılan işleme sürecinde olabileceği ileri sürülmüştür (Lee ve ark. 2015). Vázquez-Sánchez ve ark. (2012), satış noktalarından temin ettikleri deniz ürünlerinin ortalama %25'nin *S. aureus* ile kontamine olduklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar (Herrera ve ark. 2006) bu oranın taze ürünlerde %43, donmuş ürünlerde ise %30'lara kadar çıktığını ortaya koymuşlardır. Stafilokokkal infeksiyonların yaygınlığında bu bakterinin antibiyotik ve antimikrobiyal ilaçlara karşı dünya genelinde oldukça fazla direnç geliştirmiş olması etkili olabilir (Kérouanton ve ark. 2007).

Yüzeyde yapışkanlık oluşturarak gıdaları bozan ve düşük sıcaklıkta üreyebilen *Pseudomonas* spp. deniz ürünlerinde baskın florayı oluşturabilirler (Erkman 2013). Bir çok araştırmacı *Pseudomonas* spp.'nin kalamar dâhil deniz ürünleri için risk olabileceğini bildirmişlerdir (Vaz-Pires ve Barbosa 2004; Vaz-Pires ve ark. 2008). Balık etinde bulunan proteinler, bakteri kaynaklı proteazlar tarafından kolaylıkla parçalandığından birçok bakterinin gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Araştırmacılar taze palamutta toplam mezofilik aerobik bakteri 3.14 log kob/g, toplam maya-küf 2.92 log kob/g, toplam koliform bakteri 2.71 log kob/g düzeyinde, taze hamside ise aynı sıra ile 5.37 log kob/g, 2.81 log kob/g, 2.79 log kob/g seviyesinde tespit etmişlerdir (Çorapçı 2018). Gou ve ark. (2010), kalamar (*Todarodes pacificus*) örneklerinde genel hijyen için çok önemli bir belirteç olan toplam bakteri sayısını 3.91 log kob/g olarak belirlemişlerdir. Ülkemizde diğer deniz ürünlerine göre daha az avlanan kalamarın mikrobiyal kalitesine yönelik çalışmaların yetersiz kaldığı ve bu alandaki verilerin zenginleştirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, Mersin ve Sivas illeri ve çevresinde tüketime sunulan temizlenmiş ve dondurulmuş halde satılan kalamar örneklerinin mikrobiyolojik kalitesini belirlemek ve sonuçları halk sağlığı açısından değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Bu çalışmada Mersin ve Sivas illerindeki perakende satış noktalarından alınan ve soğuk zincirle laboratuvara

getirilen 100 adet donmuş kalamar örneği (yaklaşık olarak 500 g ağırlığında, 6-8 cm çapında), 4±1 °C'de çözdürüldükten sonra standart metotlar kullanılarak *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas* spp. açısından incelenmiştir.

### Mikrobiyolojik Analizler

Örneklerde *E. coli* tespiti için, hazırlanan seri dilüsyonlardan Chromocult TBX (Tyrptone Bile X-glucuronide Agar; Merck, Darmstadt, Germany) agara yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerindeki mavi-yeşil renkli koloniler *E. coli* olarak değerlendirilmiştir (ISO 2001). Çalışmamızda, *S. aureus*'u belirlemek için Baird Parker Agara (Merck, Darmstadt, Germany) seri dilüsyonlardan ekim yapılarak 35±1 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılan petrilere gelişen tüm tipik koloniler sayılmıştır. Tipik kolonilere doğrulama amacı ile koagülaz (Bactident® Coagulase rabbit, Merck, Darmstadt, Germany) testi uygulanmıştır. Gözle görülebilen bir aglütinasyon oluşturan koloniler koagülaz (+) *S. aureus* kabul edilmiştir (Halkman 2005). *L. monocytogenes* analizi, PALCAM (Merck, Almanya) ve OXFORD (Merck, Almanya) agar besiyerleri kullanılarak FDA-BAM metoduna göre yapılmıştır (US-FDA-BAM 2017). Tipik koloniler sayılarak seçilen kolonilerin doğrulaması Mini Vidas (Biomerieux, Fransa) cihazı ile yapılmıştır (Anonim 2017). *Pseudomonas* spp. sayımı için Cetrimide ilave edilmiş *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid CM0559, İngiltere) besiyeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan petrilere 25±1°C'de 2 gün inkübasyona tabi tutulmuş ve değerlendirilmiştir (Mendes ve ark. 2011).

## BULGULAR

Temizlenip, dondurularak satışa sunulan 100 adet halka kalamar örneğinin 25 tanesinde *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *L. monocytogenes* ve koagülaz (+) *S. aureus*'a rastlanmıştır. Bakteri tespit edilen örneklere ait değerler Tablo.1'de verilmiştir. Çalışmamızda örneklerin 10'unda (%10) *Pseudomonas* spp., 7'sinde (%7) *E. coli*, 5'inde (%5) *L. monocytogenes* ve 8'inde (%8) koagülaz (+) *S. aureus* tespit edilmiştir. Kalamar örneklerinde en yüksek *E. coli*, *Pseudomonas* spp. ve koagülaz (+) *S. aureus* sayısı sırasıyla, 4.7x10<sup>3</sup> kob/g, 7.0x10<sup>2</sup> kob/g ve 8.9x10<sup>2</sup> kob/g olarak tespit edilmiştir. Kalamarların üç tanesinde (%3) *Pseudomonas* spp. ve koagülaz (+) *S. aureus*'a, başka iki (%2) örnekte ise *Pseudomonas* spp. ve *E. coli*'ye birlikte rastlanmış olup, diğer örneklerde etkenler ayrı ayrı belirlenmiştir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Deniz ürünleri ile ilgili araştırma yapan Da Silva ve ark. (2010) Brezilya'da, Oh ve ark. (2007) Kore'de satış noktalarından sağlanan taze deniz ürünlerini, Simon ve Sanjeev (2007) Hindistan'da satılan donmuş ve kurutulmuş balıkçılık ürünleri çalışmışlardır. Araştırmamızda ise ülkemizdeki iki şehirden sağlanan ve dondurularak satılmakta olan kalamarların mikrobiyal kalitesi ortaya konulmuştur. Analize alınan ve mikrobiyal üreme tespit edilemeyen kalamarların, yakalama ve depolama şartlarının iyi olduğu, üretim aşamasında hijyen kurallarına dikkat edildiği ve sonrasında rekontaminasyon olmadığı, üretimin her aşamasındaki personelin kişisel hijyene dikkat ettiği ve uygulanan iyi bir gıda güvenliği sisteminin olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda, kontamine gıdalardan kaynaklanan birçok hastalık görülmekte ve bu hastalıklar özellikle hassas gruplarda (yaşlılar, çocuklar vb.) ölüme sonuçlanabilmektedir.

Su ürünleri yakalanması, üretilmesi, depolanması ve satışı sırasında mikrobiyal risklere açıktır (Ito ve ark. 2015). Bu nedenle düşük sıcaklıkta depolama işlemiyle mikrobiyal bozulma engellenerek ürünün raf ömrü uzatılabilir (Wang ve ark. 2003). Nitekim kalamar (*Todarodes pacificus*) örneklerinin soğuk muhafaza şartlarında 12 gün depolanmasıyla toplam bakteri sayısı 3.37 log kob/g artabilmektedir (Gou ve ark. 2010). Satış noktalarında kalamarların soğutulmuş olarak değil de dondurularak satılması ve bunun kontrol edilmesi gıda kalitesi ve güvenliği, halk sağlığı ve işletme ekonomisi açısından önem arz etmektedir.

*L. monocytogenes* soğuk muhafazaya alınan gıdalarda da üreyebildiği için deniz ürünleri sanayi açısından risk teşkil etmektedir. Bu nedenle birçok ülkede gıdalarda hiç bulunmaması yönünde kararlar alınmıştır. Deniz suyu ve deniz canlılarında *L. monocytogenes* ve *S. aureus* kontaminasyonu ciddi boyutlara ulaşmıştır. Son yıllarda Japon Denizi ve Güney Çin Denizi'nde; deniz suyu ve canlılarında *L. monocytogenes* sayısı sırasıyla, %5.9 ve 5.8

oranında tespit edilmiştir, *S. aureus* sayısı ise sırasıyla, %9.3 ve %20.4 olarak belirlenmiştir (Beleneva 2011). Çalışmamızda incelediğimiz örneklerin 5'inde (%5) *L. monocytogenes* ve 8'inde (%8) koagülaz (+) *S. aureus* tespit edilmesi kontaminasyonu ortaya koymaktadır. *L. monocytogenes* dondurulmuş ürünlerin çözündürülüp dondurulması ya da raflarda ısı suistimalinin olması durumunda çoğalabildiğinden gıda sektörü açısından önem arz etmektedir (Atasever 2011).

EFSA'nın 2010 yılında yayınladığı rapora göre *S. aureus*, Avrupa Birliği'nde balık ve balıkçılık ürünlerinde en fazla gıda salgınına sebep olan üçüncü bakteridir (EFSA 2010). Gıda ve çevre örneklerinde sıkça rastlanan *S. aureus* gıda işletmelerinde çalışan kişilerin saç ve derilerinden aynı zamanda ağız ve burunlarından ürünlere bulaşabilmektedir. *S. aureus* çevresel şartlara dayanıksız olmasına rağmen, bu bakteri tarafında üretilen toksinler başta ısı olmak üzere birçok faktöre karşı dayanıklıdır (Omoe ve ark. 2005).

**Tablo 1.** Dondurulmuş kalamar (*Todarodes pacificus*) örneklerinin mikrobiyolojik analiz bulguları (n=100)

**Table 1.** Microbiological analysis findings of frozen squid (*Todarodes pacificus*) samples (n=100)

	<i>E. coli</i> (kob/g)	<i>Pseudomonas</i> (kob/g)	spp.	Koagülaz (+) <i>S. aureus</i> (kob/g)	<i>L. monocytogenes</i> (Var-Yok/25 g)
1	<10	<10		<10	<b>Tespit edildi</b>
2	<10	5.0x10 <sup>1</sup>		4.4x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
3	4.2x10 <sup>3</sup>	7.0x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
4	<10	<10		<10	<b>Tespit edildi</b>
5	<10	<10		4.0x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
6	2.2x10 <sup>2</sup>	<10		<10	Tespit edilemedi
7	<10	1.0x10 <sup>2</sup>		4.0x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
8	<10	<10		7.1x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
9	5.5x10 <sup>2</sup>	<10		<10	Tespit edilemedi
10	<10	2.0x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
11	<10	2.0x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
12	<10	3.3x10 <sup>2</sup>		5.0x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
13	<10	<10		<10	<b>Tespit edildi</b>
14	1.7x10 <sup>3</sup>	3.0x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
15	<10	<10		1.6x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
16	9.4x10 <sup>2</sup>	<10		<10	Tespit edilemedi
17	<10	1.1x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
18	<10	<10		1.0x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
19	<10	<10		<10	<b>Tespit edildi</b>
20	<10	6.0x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
21	4.7x10 <sup>3</sup>	<10		<10	Tespit edilemedi
22	<10	<10		8.9x10 <sup>2</sup>	Tespit edilemedi
23	<10	<10		<10	<b>Tespit edildi</b>
24	<10	5.2x10 <sup>2</sup>		<10	Tespit edilemedi
25	5.0x10 <sup>2</sup>	<10		<10	Tespit edilemedi

Muhafaza koşulları bakterinin üremesinde çok etkili olduğundan depolama şartlarına dikkat edilmelidir. Zira bakteri sayısı  $10^6$  kob/g-ml düzeyine geldiğinde toksin üretilmektedir. Çalışmamızda örneklerin 8'inde (%8) koagülaz (+) *S. aureus* tespit edilmiştir. Ancak  $10^6$  kob/g düzeyine ulaşan bir kontaminasyon tespit edilememiştir. Bu sonuç kalamaların *S. aureus* açısından risk teşkil edebileceği anlamına gelmektedir. Öztürk ve Gündüz (2018a) analize aldıkları çiğ su ürünlerinin %58'inde, tüketime hazır su ürünlerinin ise %26'sında koagülaz pozitif *S. aureus* tespit etmişlerdir. González-Rodríguez ve ark. (2002), tütülenmiş-soğutulmuş ve vakum paketlenmiş tatl su balıklarında yaptıkları çalışmada 54 örneğin 3'ünün(%5.5) *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Normanno ve ark. (2005), çiğ tüketilen İtalyan balıkçılık ürünlerinde (mürekketbalığı vb.) bu oranı %10 olarak belirtmişlerdir. Araştırmaya konu olan su ürünlerinin farklılığı ve avlanma, işleme, muhafaza şartları gibi değişkenlerin oransal farklılığa etki ettiği düşünülmektedir. Bu riski elimine etmek için kurutulmuş kalamara "corona discharge plasma" tekniği uygulanmış ve *S. aureus* sayısında 0.9 log, toplam bakteride 2.0 log azalma sağlanmıştır (Choi ve ark. 2017).

Taze su ürünleri yakalandıkları ortama bağlı olarak değişik oranlarda bakteri ile kontamine olabilir. Ancak uygun şartlarda muhafaza edilmeleri ve işlenmeleri ile bu risk minimize edilebilmektedir (Herrera ve ark. 2006). Su ürünlerinin doğal floranın parçası olmayan stafilkokların varlığı yakalanma, üretim, işleme, paketlenme, satış ve servis aşamalarında kontaminasyonu işaret eder. Simon ve Sanjeev (2007), balıkçılık sektöründe çalışan işçilerin %62'sinin enterotoksijenik *S. aureus* yönünden pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Onmaz ve ark. (2015), satış noktalarından temin edilen balıklarda(hamsi, alabalık, çipura) bu oranı %30 olarak belirlemişlerdir. Herrera ve ark. (2006), *S. aureus* görülme sıklığını taze su ürünlerinde %43 donmuş su ürünlerinde ise %30 düzeyinde belirlemiştir. Zerai ve ark. (2012), dondurulmuş karides ve çiğ balık örneklerinin %17.5'inde *S. aureus* tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından taze ve dondurulmuş ürünlerin füme, tuzlanmış ve hazır pişmiş su ürünlerinden daha fazla *S. aureus* riski taşıdığı belirtilmiştir. Araştırmamızda ise kalamar örneklerinin %8'inde koagülaz (+) *S. aureus* tespit edilmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların üretim tekniklerinden, numune sayısı ve izolasyon metodunun farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Öztürk ve Gündüz (2018b), ısı işlem görmüş midye dolmalarında *S. aureus* sayısının <math>2.00-5.04 \log \text{ kob/g}</math>, Kök ve ark. (2015) ise *S. aureus* sayısını  $2-4.55 \log \text{ kob/g}$  olarak belirlemişlerdir. Bir gıdada *S. aureus* varlığı, uygun olmayan işleme prosesine ve çapraz bulaşma olasılığına işaret ettiğinden (Kışla ve Üzgün 2008), örneklerimizin %8'inde koagülaz (+) *S. aureus* tespit edilmiş olması, işlem görmüş deniz ürünlerinde kontaminasyon olabileceğini ortaya koymaktadır. Buz ( $2\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) içerisinde tutulan kalamaların başlangıçta  $10^2-10^3 \text{ kob/cm}^2$  olan genel canlı sayısı 12-13. günlerde  $10^4 \text{ kob/cm}^2$  sayısına ulaşmış, aynı şartlarda *Pseudomonas* ise  $4.5 \log \text{ kob/cm}^2$  düzeyinde tespit edilmiştir. Başlangıçta düşük seyreden genel canlı sayısının 10. günden sonra hızla arttığı *Pseudomonas*'ın ise depolamanın 6. gününden sonra ciddi düzeyde arttığı belirlenmiştir. Kalamar örneklerinde *Enterobacteriaceae* sayısının oldukça düşük ( $0.5 \log \text{ kob/cm}^2$ ) olduğu ve bunun da önemli olmadığı ifade edilmiştir (Vaz-Pires ve ark. 2008). Vaz-Pires ve Barbosa (2004), ahtapot örneklerinde  $2.7 \log \text{ kob/g}$  düzeyinde *Pseudomonas* belirlendiğini, bu sayının  $3 \log \text{ kob/g}$  düzeyine ulaştığında

duyusal bozukluğun başladığını belirtmiştir. Çalışmamızdaki kalamar örneklerinde bu düzeyin altında ( $1.0 \times 10^2-7.0 \times 10^2$ ) *Pseudomonas* spp. tespit edilmiştir.

Diğer deniz ürünlerinde olduğu gibi kalamarında satışında ve kabul edilebilirliğinde duyuşal mikrobiyolojik ve kimyasal nitelikleri ön plana çıkmaktadır. Huss (1998)'e göre, bakterilerin balıkların kas dokusuna geçebilmesi için  $10^6 \text{ kob/cm}^2$  düzeyine ulaşması gerekmektedir. Kalamarın da içinde bulunduğu kafadan bacaklılarda enzimatik aktivite çok hızlı olduğundan bakteriler derin dokulara ulaşacak kadar çoğalamayabilir. Çalışmamızda bazı örneklerde bakterilerin çok az tespit edilmesi ya da hiç tespit edilememiş olması bu teori ile uyumludur. Kalamar örneklerinin mikrobiyal yükünün farklı olmasında, yakalandıkları ya da yetiştirildikleri suların yanı sıra depolama, işleme ve satış noktalarının farklı hijyenik şartlarda olması ve üretimde çalışan kişilerin temizlik anlayışlarının değişken olmasının etkisi olabilir (Vaz-Pires ve Barbosa 2004). Ayrıca kalamardaki yüksek su aktivitesi ( $\geq 0.98$ ) ve nötre yakın pH ( $\geq 6.0$ ) mikrobiyal gelişim için diğer deniz ürünlerinden daha uygun ortam oluşturmaktadır (Erol 2007; Erkman 2013). Deniz ürünlerinde hijyen, yakalandığı andan itibaren gemilerde başlayan ve işleme aşamalarını takiben satış noktalarında devam eden bir süreçtir. Kalamarlar mikrobiyal açıdan iyi olan sularda yakalanmış olsa bile işleme ve paketlenme sırasında sekonder ve çapraz kontaminasyonla başta *E. coli* olmak üzere birçok bakteri ile bulaşmış olabilir. *E. coli*, gıdaya üretim ve muhafaza sırasında personelden, hammaddeden, alet ve ekipmandan bulaşabilmektedir. Çalışmamızda incelenen dondurulmuş kalamarların %7'sinde ( $2.2 \times 10^2-4.7 \times 10^3$ ) *E. coli* tespit edilmiştir. Gıdalarda *E. coli* tespiti bağırsak kaynaklı kontaminasyona ve işletmelerde uygulanan sanitasyonun yetersiz olduğuna işaret etmektedir.

Dondurma işlemi ile balıktaki mikrobiyal yük azaltılmasına rağmen ürünlerde belirli sayıda bakteri bulunabilmektedir. Vaz-Pires ve ark. (2008) 13 gün boyunca buzda depolanan kalamarların (*Illux coindetii*) *Enterobacteriaceae* sayısının  $0.5 \log \text{ kob/cm}^2$ 'yi geçmediğini bildirmişlerdir. Dondurularak ( $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) muhafaza edilen bazı deniz balıklarında (Hamsi ve Palamut) 12 aylık depolama sonunda dahi toplam mezofilik aerobik bakteri Palamutta  $2.90 \log \text{ kob/g}$ , hamside  $3.28 \log \text{ kob/g}$ , toplam maya-küf ise aynı sırayla  $2.69 \log \text{ kob/g}$ ,  $2.54 \log \text{ kob/g}$  düzeyinde belirlenmiştir (Çorapçı 2018). Ben-Gigirey ve ark.(1998),  $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 9 ay süreyle muhafaza edilen beyaz ton balıklarında (*Thunnus alalunga*) mikrobiyal yükte azalma olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda kullandığımız dondurulmuş kalamar örneklerinin  $\frac{1}{4}$ 'ünün değişik bakterilerle kontamine olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, her gıda maddesi gibi kalamarlarda üretim, depolama, satış ve servis sırasında değişik düzeylerde mikrobiyal kontaminasyona maruz kalabilmektedir. Elde edilen bulgularla kalamarlarda çapraz bulaşmaların olabileceği ve temas eden personelin kişisel temizliğine dikkat etmediği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda kalamar örneklerinin patojen (%5 *L. monocytogenes*) bakteriler açısından risk taşıyabileceği ortaya konulmuştur. Mikrobiyolojik açıdan daha iyi dondurulmuş kalamar üretmek için işletmelerde gıda güvenliği sistemleri etkin bir şekilde uygulanmalı, çalışan personel gerekli hijyen bilgisi ile donatılmalı ve soğuk zincire dikkat edilmelidir. Halk sağlığı açısından risk grubu gıdalar içerisinde değerlendirebileceğimiz deniz ürünlerinin düzenli kontrollerinin sıklıkla yapılması ve tüketicinin

deniz ürünlerinden kaynaklanabilecek sorunlarla ilgili bilgilendirilmesi önerilmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Anonim (2017).** VIDAS. Biomerieux Vidas protokolü. VIDAS LMO2 AFNOR BIO-12/11-03/04).
- Atasever MA (2011).** Kıymalarda bazı patojenlerin izolasyon ve identifikasyonu. Tez (Doktora). Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Beleneva IA (2011).** Incidence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from the Japan and South China seas. *Mar Pollut Bull*, 62, 382-387.
- Ben-Gigirey B, Sousa JMB, Villa TG, Barros-Velazquez J (1998).** Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J Food Prot*, 61, 608-615.
- Bogdanovicova K, Necidova L, Harustiakova D, Janstova B (2017).** Milk powder risk assessment with *Staphylococcus aureus* toxigenic strains. *Food Control*, 73, 2-7.
- Choi KD, Park UY, Shin IS (2012).** Microbial contamination of seasoned and dried squid *Dosidicus gigas* during processing. *Korean J Fish Aquat Sci*, 45, 445-453.
- Choi S, Puligundla P, Mok C (2017).** Effect of corona discharge plasma on microbial decontamination of dried squid shreds including physico-chemical and sensory evaluation. *LWT - Food Sci Technol*, 75, 323-328.
- Çorapçı B (2018).** Ön işlemsiz donmuş depolanan (-22± 1 °C) hamsi (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus 1758) ve palamut (*Sarda sarda*, Bloch 1793) balıklarının duyuşsal, besinsel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Gıda*, 43, 1075-1090.
- Da-Silva ML, Matté GR, Germano PML, Matté MH (2010).** Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil. *J Food Safety*, 30, 94-110.
- Deng Y, Wang Y, Song X, Huang H, Qian B, Zhang H (2012).** Changes in soluble protein and antioxidant property of squid (*Illex illecebrosus* LeSueur) fillets dried in a heat pump dryer using far-infrared radiation. *Philipp Agric Sci*, 95, 386-393.
- EFSA (2010).** European Centre for Disease Prevention and Control, 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 8, 1496.
- Erkman O (2013).** Gıda Mikrobiyolojisi. Efil Yayınevi, Ankara.
- Erol İ (2007).** Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Fenlon DR (1999).** *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In "Listeria, Listeriosis and Food Safety", (Ed), Ryser ET, Marth EH, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- González-Rodríguez MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, García-López ML (2002).** Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int J Food Microbiol*, 77, 161-168.
- Gou J, Lee HY, Ahn J (2010).** Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage. *Food Chem*, 119, 471-476.
- Halkman K (2005).** Merck Mikrobiyoloji El Kitabı. Başak Matbaacılık, Ankara.
- Herrera FC, Santos JA, Otero A, García-López ML (2006).** Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *J Appl Microbiol*, 100, 527-536.
- Huss HH (1998).** El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. [FAO Documento Técnico de Pesca No. 348]. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- International Organization for Standardization (ISO 16649-2) (2001).** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- Ito M, Shiozaki A, Shimizu M, Saito S (2015).** Hemolytic- uremic syndrome with acute encephalopathy in a pregnant woman infected with epidemic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: characteristic brain images and cytokine profiles. *Int J Infect Dis*, 34, 119-121.
- Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, et al. (2007).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*, 115, 369-375.
- Kışla D, Üzgün Y (2008).** Microbiological evaluation of stuffed mussels. *J Food Prot*, 71, 616-620.
- Kök F, Şahiner C, Koçak P, Göksoy EÖ, Beyaz D, Büyükyörük S (2015).** Determination of microbiological quality of stuffed mussels sold in Aydın and İzmir. *MANAS J Eng*, 3, 70-76.
- Lee ES, Park SY, Ha SD (2015).** Effect of UV-C light on the microbial and sensory quality of seasoned dried seafood. *Food Sci Technol Int*, 22, 213-220.
- Liston J (1990).** Microbial hazards of seafood consumption toxins, bacteria and viruses are the principal causes of sea foodborne diseases. *Food Technol*, 44, 58-62.
- Mendes R, Silva HA, Anacleto P, Cardoso C (2011).** Effect of CO<sub>2</sub> dissolution on the shelf life of ready-to-eat *Octopus vulgaris*. *Innov Food Sci Emerg*, 12, 551-561.
- Normanno G, Firinu A, Virgilio S, et al. (2005).** Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol*, 98, 73-79.
- Oh SK, Lee N, Cho YS, Shin DB, Choi SY, Koo M (2007).** Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *J Food Protect*, 70, 1153-1158.
- Omoe K, Dong-Liang H, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K (2005).** Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 246, 191-198.
- Onmaz NE, Abay S, Karadal F, Hizlisoy H, Telli N, Al S (2015).** Occurrence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in retail fish samples in Turkey. *Mar Pollut Bull*, 90, 242-246.
- Öztürk F, Gündüz H (2018a).** İzmir'de satışa sunulan su ürünlerinde koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus*'un insidansı ve antibiyotik direnci. *Gıda*, 43, 313-320.
- Öztürk F, Gündüz H (2018b).** Tüketime hazır midye dolmalarının mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi. *Gıda*, 43, 745-750.
- Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, Alonso-Calleja C, Capita R, Prieto M (2011).** Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT - Food Sci Technol*, 44, 1251-1260.
- Rocourt J, Cossart P (1997).** *Listeria monocytogenes*. In: "Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers", (Ed), Doyle MP, Buechat LR, Montville TJ, American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington DC.
- Rodas-Suárez OR, Flores-Pedroche JF, Betancourt-Rule JM, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C (2006).** Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Appl Environ Microb*, 72, 7410-7412.
- Simon SS, Sanjeev S (2007).** Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*, 18, 1565-1568.
- Teplitski M, Wrigh AC, Lorca G (2009).** Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 185-190.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2019).** Avlanan diğer deniz ürünleri (kabuklu, yumuşakçalar) miktarı.
- US-FDA (2017).** Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods.
- Vázquez-Sánchez D, López-Cabo M, Saá-Ibuzquiza P, Rodríguez-Herrera JJ (2012).** Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *Int J Food Microbiol*, 157, 286-296.
- Vaz-Pires P, Barbosa A (2004).** Sensory, microbiological, physical and nutritional properties of iced whole common octopus (*Octopus vulgaris*). *LWT - Food Sci Technol*, 37, 105-114.
- Vaz-Pires P, Seixas P, Mota M, et al. (2008).** Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*) stored in ice. *LWT - Food Sci and Technol*, 41, 1655-1664.
- Wang H, Liceaga-Gesualdo AM, Li-Chan ECY (2003).** Biochemical and physical characteristics of muscle and natural actomyosin isolated from young Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at 0 and 4 °C. *J Food Sci*, 68, 784-789.
- Zarei M, Maktabi S, Ghorbanpour M (2012).** Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. in seafood products using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathog Dis*, 9, 108-112.





## Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection Epidemiology at Dairies in the Province of Afyonkarahisar

Ömer Barış İNCE 

*Pamukkale University, Animal Breeding and Genetic Research and Implementation Center, Denizli, Turkey*

Received: 03.05.2020

Accepted: 21.07.2020

### ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) is a cause of viral diseases in cattle, which are commonly seen around the world and cause considerable reproductive problems and economic loss. This study was conducted to investigate the epidemiology of BVDV infection in dairy cattle herds in the Afyonkarahisar Province. In this study, blood samples were taken from a total of 240 cows from dairy herds (n = 10) between 2017 and 2019. Serum samples were examined by using commercial ELISA test kits in order to determine the presence of antibody (Ab) and antigen (Ag) against BVDV. According to the test results, 98 (40.83%) of the serum samples were found to be positive while 4 (1.67%) of them had persistent infection. In addition, samples were found to be seropositive at the rate of 18.06%, 44.80% and 67.44% for the age groups of 6-24 months, 24-48 months and over 48 months, respectively. It was determined that the seropositivity among age groups were statistically significant (P<0.05). It was observed that the age-related seropositivity of animals increased in direct proportion. The data obtained from the results of this study show the presence of BVDV infection at the dairy cattle herds in Afyonkarahisar and nearby provinces. For this reason, implementation of the voluntary or obligatory eradication programs to prevent for prevention of further spread of this virus, are of importance for regional and national economy.

**Keywords:** Cattle, BVDV, Epidemiology, ELISA

### ÖZ

### Afyonkarahisar İli Süt Sığırı İşletmelerinde Bovine Viral Diyare Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Epidemiyolojik Araştırılması

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) dünya genelinde yaygın olarak gözlemlenen ve önemli üreme problemlerine ve ekonomik kayıplara neden olan sığırların viral hastalık etkenidir. Bu çalışma Afyonkarahisar İli süt sığırı işletmelerinde BVDV enfeksiyonu epidemiyolojisinin araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışma kapsamında 2017-2019 yılları arasında süt sığırı işletmelerinden (n = 10) toplamda 240 adet dişi sığır kan örnekleri toplandı. Serum örnekleri BVDV'ye karşı antikor (Ab) ve antijen (Ag) varlığını belirlemek için ticari ELISA test kitleri kullanılarak incelendi. Test sonuçlarına göre serum örneklerinin 98'i (%40.83) pozitif ve 4 tanesi (%1.67) persiste enfekte bulundu. Ayrıca örnekler, 6- 24 ay, 24-48 ay ve 48 ay üstü yaş aralığında sırasıyla %18.06, %44.80 ve %67.44 seropozitif bulundu. Yaş grupları arasındaki seropozitifliğin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi (P<0.05). Hayvanların yaşa ilişkin olarak seropozitifliğin doğru orantılı arttığı gözlemlendi. Mevcut çalışmanın sonuçlarından elde edilen veriler, Afyonkarahisar İli ve çevresinde bulunan süt sığırcılığı işletmelerinde BVDV enfeksiyonunun varlığını göstermektedir. Bu nedenle söz konusu viral etkenin daha fazla yayılmasını önlemek için gönüllü veya zorunlu eradikasyon program uygulamalarının bölge ve ülke ekonomisi için önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Sığır, BVDV, Epidemiyoloji, ELISA

### INTRODUCTION

BVD is a worldwide cattle disease included in the OIE list which is known for its important effect on animal health, welfare and production (OIE 2017). BVDV belongs to the *Pestivirus* genus in the family *Flaviviridae*. It has a single strand stranded of positive-sense RNA. BVDV is globally

found in domestic and wild ruminants, and its symptoms are fever, gastrointestinal lesions, diarrhea, abortion in pregnant cattle, congenital defects, malformations and mortality in new born calves (Lanyon et al. 2014; Şevik 2018; Mirosław and Polak 2019). Vertical infection in early pregnancy period may result in the birth of persistently infected calves, which is highly important in epidemiology



of BVDV persistent infection (Nikbakht et al. 2015). After infection is identified in a herd, it progresses in two forms as persistent infection and transient infection. Persistent infections are the main epidemiological agents causing spread and persistency of a disease in a cattle herd (Ezannoet al. 2007). Persistently infected animals are of greater importance compared to transiently infected cattle, since they carry BVDV throughout their life and are the main source for transmission of the virus (Brownlie et al. 1987; Scharnböck et al. 2018; Olum et al. 2020). BVDV infected cattle may be seronegative during the first 40-120 days of gestation however; infection may lead to the birth of persistently infected calves. If the persistently infected animals shed virus in high titres and they are not taken away from the herd after being identified, they cause BVDV to remain within the herd (Lindberg and Houe 2005; Mirosław and Polak 2019).

Although BVDV infection is detected in persistently infected animals at the rate of 1-2% across the world, a prevalence varying between 40-90% has been reported (Houe 1995; Duong et al. 2008; Zemke et al. 2010). In Turkey, the prevalence of BVDV infection varies between the rates of 40-92% while persistently infected animal presence changes between 0.01-4.9% (Alkanet al. 2001; Burgu et al. 2003; Avcı and Yavru 2013; Bilgili and Mamak 2019). Seroprevalence of the BVDV infection and the role of BVDV in clinical pictures of the disease have been identified in the studies conducted in Turkey (Bilgili and Mamak 2019).

ELISA kits are preferred in studies on BVDV infection since they provide fast screening of many samples, and they are sensitive and economic (Alvarez et al. 2012; Tavella et al. 2012; Lanyon et al. 2013; Gonzalez et al. 2014; Hanon et al. 2018). In this study, epidemiology of BVDV infection was investigated by using ELISA method in dairy cattle herds in the Afyonkarahisar Province.

## MATERIALS and METHODS

### Collecting, processing and preserving samples

In this study, 240 Holstein dairy cows, aged between 6-60 months, were sampled from dairy cattle herds (n =10) by random sampling. All sampled cattle were clinically healthy and were not vaccinated against BVDV. Blood samples (10 ml) were taken from *vena jugularis* of animals in compliance with animal welfare. Then, blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes in order to obtain serum. Blood samples were kept at -20°C until analysis after having been subjected to inactivation by being kept at 56°C for 30 minutes.

### ELISA Test and Statistical analysis

This study was conducted by using BVDV (Ab)-ELISA (IDEXX BVDV-Total Ab, Switzerland) and BVDV (Ag)-ELISA (IDEXX BVDV Ag test, Switzerland) commercial kits. Collected serum samples were examined by indirect ELISA (BVDV-(Ab) ELISA) regarding the presence of antibody developing against BVDV. The optical density (OD) values of test results were read in an ELISA reader at 450 nm wavelength. Antibody inhibition percentages of serum samples were calculated in line with the following formula.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{OD values of samples}}{\text{Negative OD value}} \times 100$$

The samples with values of 0.30 and below were evaluated as negative, those between 0.20 and 0.30 were assessed suspect, and those above 0.30 were accepted positive.

The test, based on the principle of identifying viral antigens in study samples for detection of BVDV antigen presence, was conducted in accordance with the procedures of producing company. Data processing was performed in R program (R Core Team 2018). Chi-square tests were utilized in order to investigate whether there were any relationships between age groups. P<0.05 value was accepted statistically significant.

## RESULTS

According to indirect ELISA test results in terms of antibody, out of 240 cattle, 98 were found positive (40.83%) and 142 were found negative (59.17%). The cattle were categorized into 6-24 months, 24-48 months and above 48 months distribution according to age groups. Thirteen (18.06%) of 72 animals in the 6-24 months age group, 56 (44.80%) of 125 animals in the 24-48 months age group and 29 (67.44%) of 43 animals in above 48 months age group were found to be positive, respectively (Table 1 and 2).

A total of 4 animals were found to be positive in 1 herd in terms of antigen according to indirect ELISA test results. Taking the state of persistently infected animals into account, blood samples were received from the animals with positive results for the second time after 45 days to look for antigen. As the test results of these 4 animals were found to be positive for the second time, they were considered persistently infected y animals (Table 1).

## DISCUSSION

It is known that persistently infected animals in herds are the main causes of prevalence and spread of BVDV infection in cattle herds and that many virus particles are transmitted through these animals. It is urged that the cause spreading to persistently infected young cows depends on the increase in prevalence of disease (Schweizer and Peterhans 2014; Ran et al. 2019). It is also argued that it is necessary to apply intervention methods, including sorting strategy and animal vaccination, in order to reduce BVDV prevalence in herds, including the herds with persistently infected animals (Newcomer et al. 2017). The calves born with persistent BVDV infection, and infertility and, calve with congenital anomalies show the significance of the disease in economical respect. For this reason, in this study, the samples were investigated in terms of antigen and antibody presence in order to assess BVDV infection in epidemiological respects. The investigation concluded that while 98 (40.83%) animals were found to be positive for antibody, 4 (1.67%) animals were found to be positive in terms of antigen. It was reported in interviews made with the herd owners that abortion cases were previously seen in some herds. In this regard, it is argued that BVDV antibody positive rate of 40.83% may be related to the sampling of the animals, which were infected and then recovered.

In our country, the studies on prevalence of BVDV in epidemiological respects have been carried out from time to time. The seropositivity rates found in some studies conducted in Turkey are as follows: 86% in the study carried out by Tan et al. (2006) in the province of Aydın and its surrounding, 20.19% in the study conducted by Yazıcı et al. (2007) in the province of Sivas and its surrounding, 75-82% in the study conducted by Kale (2007), Öztürk et al. (2012) in the province of Burdur and its surrounding, 49.9% in the study performed by Şişman

(2008) in the province of Muğla and its surrounding, 75.22% in the study by Bilgili and Mamak (2019) in the province of Isparta and its surrounding. In addition, the following seropositivity rates were found in the studies carried out in Konya and its surrounding: 79.5% in the study by Şimşek and Öztürk (1997), 44.09% in the study by Yavru et al. (2005), 46.22% in the study by Avcı and Yavru (2013). In this study, BVDV infection prevalence was found to be 40.83%. This rate is similar to the rates found by Yavru et al. (2005), Avcı and Yavru (2013) in the studies carried out in Konya and its surrounding and by Şişman (2008) in the study conducted in the province of Muğla and its surrounding. This rate is lower than the ones identified in the studies administrated in the provinces of Aydın, Burdur and Isparta. It is considered that this may be associated with the sample number used in the study, care and feeding conditions of animals.

In some cases, the BVDV prevalence may have relationship with age range, herd size and type or raising method (Fulton et al. 2009; Ma et al. 2016; Selim et al. 2018). It was determined in the distribution of age groups in this study that as the age increased, the positivity increased according to the correlation test between positivity and seronegativity. The relationship among age groups was found to be statistically significant ( $P < 0.05$ ). This result is in parallel with the ones found by other researchers (Mockeliuniene et al. 2004). Epidemiological studies on the positivity rate of persistently infected animals have been carried out in the world and Turkey. While the prevalence

of persistently infected animals in a herd varies between 1-2% across the world, it is argued that the high positivity rate is an indicator of presence of persistently infected animal presence in a herd (Houe and Meyling 1991; Houe 1999; Wittum et al. 2001; Hashemi et al. 2010).

The persistent infection rate in the studies conducted in different regions of our country have been reported as follows: 0.7% by Şimşek and Öztürk (1997), 3.07% by Ak et al. (2002), 0.61-0.83% by Burgu et al. (2003), 0.1% by Bulut et al. (2006), 4.9% by Tan et al. (2006). In this study, 4 of 240 animals (1.67%) were determined to be persistently infected. The persistent infection rate found in this study is in compliance with the rate found by other researchers (Şimşek and Öztürk 1997; Burgu et al. 2003; Houe and Meyling, 1991; Houe 1999; Wittum et al. 2001; Bulut et al. 2006; Hashemi et al. 2010). While percentage differences in the study may originate from the fact that persistently infected animals were removed from the herd in previous studies (Şimşek and Öztürk 1997; Bulut et al. 2006) conducted in related study fields, no persistently infected animals could be identified or existed in related areas; high persistent infection rate may arise from the lack of awareness of taking protection and control measures against BVDV infection. When the seropositivity and persistent infection rate of BVDV infection are evaluated together, it may be noted that removing persistently infected animals from herds, taking and applying bio safety measures, ensuring protection and control of the disease are importance for livestock sector

**Table 1.** Results of the BVDV-Ab and BVDV-Ag Analyses

Number Herds	of	Number Samples	of	BVDV (Ab)-ELISA			BVDV (Ag)-ELISA		
				Positive	Negative	Percentage	Positive	Negative	Percentage
1		28	8	20	28.57%	0	28	0.00%	
2		30	19	11	63.33%	4	29	13.33%	
3		27	13	14	48.15%	0	27	0.00%	
4		24	9	15	37.50%	0	23	0.00%	
5		18	8	10	44.44%	0	18	0.00%	
6		20	13	7	65.00%	0	20	0.00%	
7		15	5	10	33.33%	0	15	0.00%	
8		27	6	21	22.22%	0	25	0.00%	
9		26	8	18	30.77%	0	26	0.00%	
10		25	9	16	36.00%	0	25	0.00%	
Total		240	98	142	40.83%	4	236	1.67%	

**Table 2.** Percentage of animals between age groups.

Age	Number of samples	Positive	Negative	Percentage*
06-24 months	72	13	59	18.06%
24-48 months	125	56	69	44.80%
48 months<	43	29	14	67.44%
Total	240	98	142	40.83%

\* $P < 0.05$

## CONCLUSION

BVDV infection is considered as a problem in the dairy cattle herds. In Turkey, any voluntary or obligatory control and eradication programs have not been introduced against the BVD disease yet. The herds are trying to establish control with inactive BVDV vaccines. It has been concluded that more comprehensive research should be carried out in planning and implementation of a wide range of voluntary or obligatory eradication programs on a regional and national basis in order to reduce the incidence of diseases related to BVDV infection.

## CONFLICT of INTEREST

The author declares that she has no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

In this study, no human-related data were collected and all data were obtained on the basis of routine veterinary medicine and owners of animals allowed the blood sampling. Animal welfare and ethical rules were considered in taking blood samples. This study does not involve any animal experiment or human subject. The author thanks to his colleagues and technicians at the Ministry of Agriculture and Forestry, provincial organization due to their support in this study.

## REFERENCES

- Alkan F, Yeşilbağ K, Burgu İ (2001).** Persiste Enfekte Sığırlarda BVDV 'nin Organ Dağılımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 48, 111-115.
- Ak S, Firat İ, Bozkurt HH et al. (2002).** The Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infections in Cattle and Existence of Persistently Infected Cattle in the Trakya Region. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 245-248.
- Alvarez M, Donate J, Makoschey B (2012).** Antibody Responses against Non-Structural Protein 3 of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Milk and Serum Samples from Animals Immunised with an Inactivated Vaccine. *Vet J*, 191, 371-376.
- Avcı O, Yavru S (2013).** Investigation of Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus and Bovine Herpesvirus-4 in a Dairy Herd with Naturally Infected in Konya. *Eurasian J Vet Sci*, 29, 82-86.
- Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ et al. (1987).** Pathogenesis and Epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection of Cattle. *Annal Vet Res*, 18(2), 157-166.
- Bilgili İ, Mamak N (2019).** Isparta İli ve Çevresinde Sığırçılık İşletmelerinde Bovine Viral Diyarre Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Serolojik Olarak Araştırılması. *MAKU J Health Sci Inst*, 7(2), 105-113.
- Bulut O, Yavru S, Yapıkçı O (2006).** Sütçü Sığırların Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) ve Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Enfeksiyonları Yönünden Elisa ile Araştırılması. *Hay AraşDerg*, 16(2), 18-24.
- Burgu İ, Alkan F, Özkul A et al. (2003).** Türkiye'de Süt Sığırçılığı İşletmelerinde Bovine Viral Diarrhea (BVDV) Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi ve Kontrolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50, 127-133.
- Duong MC, Alenius S, Huong LTT et al. (2008).** Prevalence of Neospora Caninum and Bovine Viral Diarrhoea Virus in Dairy Cows in Southern Vietnam. *Vet J*, 175(3), 390-394.
- Ezanno P, Fourichon C, Viet AF et al. (2007).** Sensitivity Analysis to Identify Key-Parameters in Modelling the Spread of Bovine Viral Diarrhoea Virus in a Dairy Herd. *Prev Vet Med*, 80, 49-64.
- Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ et al. (2009).** Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Persistently Infected Cattle and Bvdv Subtypes in Affected Cattle in Beef Herds in South Central United States *Can J Vet Res*, 73, 283-291.
- Gonzalez AM, Arnaiz I, Yus E, et al. (2014).** Evaluation of Long-Term Antibody Responses to Two Inactivated Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Vaccines. *Vet J*, 199, 424-428.
- Hanon JP, Baere MD, Ferté C, et al. (2018).** Serological Monitoring on Milk and Serum Samples in a BVD Eradication Program: A Field Study in Belgium Showing Antibody ELISA Performances and Epidemiological Aspects. *Prev Vet Med*, 160, 136-144.

- Hashemi GR, Haghparast A, Naseri, Z (2010).** Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Antibodies and Antigen among the Aborted Dairy Cows in Industrial Dairy Cattle Herds in Mashhad Area-Iran. *World Applied Sciences J*, 8(5), 635-640.
- Houe H (1995).** Epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus Veterinary Clinics of North America. *Food Animal Practice*, 11, 521-547.
- Houe H (1999).** Epidemiological Features and Economical Importance of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) Infections. *Vet Microbiol*, 64(2-3), 89-107.
- Houe H, Meyling A (1991).** Prevalence of Bovine Virus Diarrhoea (BVD) in 19 Danish Dairy Herds and Estimation of Incidence of Infection in Early Pregnancy. *Prev Vet Med*, 11, 9-16.
- Kale M (2007).** Sığırlarda Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Enfeksiyonunun Fertilitelilişkinin Araştırılması. TÜBİTAK Projesi. Proje No: 1060366 Burdur. s. 1-116.
- Lanyon SR, Anderson M, Bergman E et al. (2013).** Validation and Evaluation of a Commercially Available Elisa for the Detection of Antibodies Specific to Bovine Viral Diarrhoea Virus (Bovine Pestivirus). *Aust Vet J*, 91, 52-56.
- Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP et al. (2014).** Bovine Viral Diarrhoea: Pathogenesis and Diagnosis. *Vet J*, 199, 201-209.
- Lindberg A, Houe H (2005).** Characteristics in the Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) of Relevance to Control. *Prev Vet Med*, 72, 55-73.
- Ma JG, Cong W, Zhang FH, et al. (2016).** Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection in Yaks. (*Bos grunniens*) in Northwest China. *Trop Anim Health Prod*, 48, 1747-1750.
- Mockeliuniene V, Salomskas A, Mockeliunas R, et al. (2004).** Prevalence and Epidemiological Features of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Lithuania. *Vet Microbiol*, 99, 51-57.
- Miroslaw P, Polak M (2019).** Increased genetic variation of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle in Poland. *BMC Vet Res*. 15(1), 278. doi: 10.1186/s12917-019-2029-z. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-2029-z> Access date:12.09.2019
- Newcomer BW, Chamorro MF, Walz PH (2017).** Vaccination of Cattle against Bovine Viral Diarrhea Virus *Vet Microbiol*, 206, 78-83.
- Nikbakht G, Tabatabaei S, Lotfollahzadeh S et al. (2015).** Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus, Bovine Herpesvirus 1 and Bovine Leukaemia Virus in Iranian Cattle and Associations among Studied Agents. *J App Ani Res*, 43(1), 22- 25.
- OIE. (2017).** Listed Diseases, Infections and Infestation in Force in 2017 World Organisation for Animal Health. Available from: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/> Access date: 02.08.2019
- Olum MO, Mungube EO, Njanja J et al. (2020).** Seroprevalence of Canine Neosporosis and Bovine Viral Diarrhoea in Dairy Cattle in Selected Regions of Kenya. *Transbound Emerg Dis*, doi: 10.1111/tbed.13429 Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.13429> Access date:10.04.2020.
- Öztürk D, Kale M, Pehlivanoglu F et al. (2012).** Evaluation for Some Bacterial and Viral Abortions of Dairy Cattle Farms in Burdur District of Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 18(2), 255-258.
- R Core Team 2018.** R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online: <http://www.R-project.org>. Access date: 01.06.2018.
- Ran X, Chen X, Ma L, et al. (2019).** A Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle in China. *Acta Tropica*, 190(2), 296-303.
- Scharnböck B, Roch FF, Richter V et al. (2018).** A Meta-Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Prevalences in the Global Cattle Population. *Scientific Reports*, 8(1), 14420.
- Schweizer M, Peterhans E (2014).** Pestiviruses. *Annu Rev Anim Biosci*, 2, 141-163.
- Selim AM, Elhaig MM, Moawed SA et al. (2018).** Modeling the Potential Risk Factors of Bovine Viral Diarrhea Prevalence in Egypt Using Univariable And Multivariable Logistic Regression Analyses. *Vet World*, 11, 259-267.
- Şevik M (2018).** The Role of Pestiviruses (BDV and BVDV) in Ruminant Abortion Cases in the Afyonkarahisar Province. *Kocatepe Vet J*, 11(3), 238-244.
- Şimşek A, Öztürk F (1997).** Klinik Olarak Sağlık Sığır Sürülerinde Persiste Bovine Viral Diarrhea Virus Enfeksiyonlarının Araştırılması ve Epizootiyolojik Önemi. *Vet Bil Derg*, 13(2), 113-119.
- Şişman E (2011).** Muğla İli çevresinde sığırçılık işletmelerinde Bovine Viral Diyarre (BVDV) enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Yüzcüncü Yıl Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.

- Tan MT, Karaođlu T, Erol N et al. (2006).** Serological and Virological Investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle Herds in Aydın province. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 299-304.
- Tavella A, Zambotto P, Stifter E et al. (2012).** Investigation to the Specificity of Positive BVDV Results in Ear Notch Samples: Review on The Five-Year-Old Experience in the Autonomous Province of Bolzano (Italy). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 125, 326-331.
- Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock, K.V et al. (2001).** Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in US Beef Herds. *Prev Vet Med*, 49, 83-94.
- Yavru S, Şimşek A, Yapkıç O et al. (2005).** Serological Evaluation of Viral Infections in Bovine Respiratory Tract. *Acta Vet Beograd*, 55, 219-226.
- Yazıcı Z, Okur GS, Albayrak H (2007).** Serological Profile of some Viral Infections in Unvaccinated Cattle in Turkey. *MedycynaWeterinarnyina*, 63(2), 187-189.
- Zemke J, Konig P, Mischkale K, Reimann I, Beer M (2010).** Novel BVDV-2 Mutants as New Candidates for Modified-Live Vaccines. *Vet Microbiol*, 142(1-2), 69-80.



## Investigation of In-Vitro Antibacterial Activity of *Cotinus coggygria* Scop. Extracts

Gülşen GONCAGÜL<sup>1</sup> Çiğdem GÜCEYÜ<sup>2</sup> Elçin GÜNAYDIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ University, Mennan Pasinli Equine Vocational School, Bursa, Turkey

<sup>2</sup> Bursa Uludağ University, Technical Science Vocational School, Bursa, Turkey

<sup>3</sup> Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Kastamonu, Turkey

Received: 25.05.2020

Accepted: 28.08.2020

### ABSTRACT

From the ancient times to nowadays plants were known to be used for the treatment of numerous diseases. With the widespread use of antibiotics in the treatment of diseases for the past 30-40 years, pathogenic microorganisms have been reported to gain resistance to antibacterials. Due to development of resistance to antibiotics, investigation of the effects of therapeutic agents found in plants has become increasingly important. *Cotinus coggygria* Scop (Tetra) plant, which grows in the Thrace Region in our country, southern and southeast Europe has been used in traditional treatments for people living in different geographies. It is aimed to determine the antibacterial effect of the ethanol extract of the herbal plant, *Cotinus coggygria* Scop. against standard strains *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Escherichia coli* (ATCC® 25922) and *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in intensive care units. In this context, the antibacterial effect of the herbal plant was compared with the currently used antibiotics such as ampicillin (AM), cefazolin (CZ), cefuroxime (CXM), meropenem (MEM), colistin (CL), ofloxacin (OFX), sulfamethoxazole / trimethoprim (SXT), tetracycline (TE), gentamicin (GM). In parallel with the increasing volumetric amounts of the extract obtained in the study, it was found that the antibacterial effect on the tested bacteria increased. As a result, the ethanol extract of the herbal plant, *Cotinus coggygria* Scop. was determined to show antibacterial activity against Gram (+) and Gram (-) bacteria. For the further studies, we thought that it will be beneficial to use this plant extract as an antibacterial agent in health services, in addition to this, benefit from its antibacterial effect in industrial areas.

**Keywords:** Antibacterial effect, Antibiotic susceptibility, Bacteria, *Cotinus coggygria* Scop.

### ÖZ

## *Cotinus coggygria* Scop. (Tetra) Bitkisinin Etanol Ekstraktının Antibakteriyel Aktivitesinin İn Vitro Araştırılması

Antik çağlardan günümüze bitkilerin çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Son 30-40 yıl boyunca antibiyotiklerin hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmasıyla birlikte, patojenik mikroorganizmaların antibakteriyellere karşı direnç kazandığı bildirilmiştir. Antibiyotiklere direnç gelişmesi nedeniyle, bitkilerde bulunan terapötik ajanların etkilerinin araştırılması giderek önem kazanmıştır. Güney ve Güneydoğu Avrupa'da ve ülkemizde Trakya Bölgesi'nde yetişen *Cotinus coggygria* Scop. (Tetra) bitkisi farklı coğrafyalarda yaşayan insanların geleneksel tedavilerinde kullanılmıştır. Bu çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinin etanol ekstraktının standart suşlar *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Escherichia coli* (ATCC® 25922) ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilmiş *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* 'ya karşı antibakteriyel etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, bitkinin antibakteriyel etkisi günümüzde kullanılan ampisilin (AM), sefazolin (CZ), sefuroksim (CXM), meropenem (MEM), kolistin (CL), ofloksasin (OFX), sulfametoksazol/ trimetoprim (SXT), tetrasiklin (TE), gentamisin (GM) gibi antibiyotiklerle karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen ekstraktın artan hacimsel miktarlarına paralel olarak, test edilen bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinin arttığı saptanmıştır. Sonuç olarak, *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinin etanol ekstraktının, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha ileri çalışmalar için, bu bitki ekstraktının sağlık hizmetlerinde antibakteriyel bir ajan olarak kullanılmasının ve endüstriyel alanlarda antibakteriyel etkisinden faydalanmanın avantajlı olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyel etki, Antibiyotik duyarlılığı, Bakteriler, *Cotinus coggygria* Scop.



## GİRİŞ

Çok eski zamanlardan bu yana hastalıkların tedavi edilmesinde bitkilerden yararlanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kaynaklarına göre tedavi amaçlı kullanılan bitkiler aynı zamanda gıdalara tat, koku ve renk vermede kullanılmıştır. Doğal bitkiler ve onlardan elde edilen özütlerin antimikrobiyal etkileri birçok araştırmanın konusunu oluşturmuştur. Antimikrobiyal aktivite gösteren bitkiler; tıbbi amaçlı, gıdalarda koruyucu madde olarak, bitki zararlılarına ve yabancı otlara karşı uygulanmıştır. Günümüze kadar gelen süreçte, sağlık otoritelerinin de üzerinde durduğu bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımı, patojenler arasında ilaç direnç mekanizmasının evrimine yol açmıştır (Centres for Disease Control and Prevention (US) 2013; WHO 2014; Kiffer ve ark. 2007; Al Johani ve ark. 2010). Böylece, patojen etkenlerin, antibiyotiklere karşı, doğal, kazanılmış, genetik, fenotipik veya biyolojik olarak etkilerini önleyici çeşitli mekanizmalar geliştirdiği bildirilmiştir (Thomas ve Singh 2013).

Bu ilaç etkisizleştirme mekanizmaları, antibiyotiklerin enzimatik hidrolizini, grup transferini, ribozom korumasını ve biyofilm oluşumunu içerir (Wright, 2005; Roberts, 2005; Høiby ve ark. 2010). İnsan ve hayvanların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeniyle, tüm dünyada binlerce bitki tedavi amaçlı kullanılır hale gelmesi ve son 30-40 yıl içerisinde bitkisel ilaçlara doğru gün geçtikçe artan bir yönelme görülmüştür (Bektaş, 2011; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Mikroorganizma orijinli hastalıkların tedavisinde bitkisel kaynaklı ilaçlar umut kaynağı olmaya başlamıştır. Bunun nedenle bitkilerin kimyasal bileşimlerinin belirlenmesi ve antimikrobiyal mekanizmalarının çözülmesi ile ilgili son yıllarda birçok araştırmalar yapılmıştır (Erdoğan ve Everest, 2013). Araştırmalarda bitkilerden elde edilen, farmakolojik özelliklere sahip olduğu tespit edilen tanenler, terpenoidler, alkaloidler ve flavonoidler gibi çok değerli ve elverişli çeşitli ikincil metabolitler belirlenmiştir (Georgiev ve ark.2014; Haddad-Kashani ve ark. 2012; Ngule ve Swamy, 2013). Dünyanın birçok yerinde, özellikle gelişmekte olan ülkelerin kırsal kesimlerinde, bitkiler ve doğal ürünler, sentetik ilaçlardan daha az zararlı etkiye sahip olması nedeniyle, birincil tedavi kaynağı olarak kullanılmaya devam etmiştir (Ballabh ve Chaurasia, 2007; Chitme ve ark. 2004).

"Duman ağacı" olarak da bilinen *Cotinus coggygria* Scop., *Anacardiaceae* familyasından bir süs bitkisidir. Bu bitki Güney Avrupa, Orta Çin ve Himalayalar'a kadar geniş bir coğrafyada yetişir. Birçok ülke de antienflamatuar, antimikrobiyal etkileri nedeniyle cilt ve mukozal dokuların yaralanmalarının tedavisinde kullanılmıştır (Demirci ve ark.2003). Ayrıca bu kullanımlarına ilave olarak hepatobiliyer bozukluklarda, hepatit ve ateşin düşürülmesinde de kullanıldığı bildirilmiştir (Rendeková ve ark. 2016). Bu tür endikasyonlar, tanen, esansiyel yağlar ve çeşitli flavonoidlerin içeriği ile desteklenir (Novaković ve ark. 2007; Westenburg ve ark. 2000; Demirci ve ark. 2003; Tzakou ve ark. 2005). Yapılan farklı araştırmalarda, *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinin farklı kısımlarının, potansiyel antiseptik, antienflamatuar etkileri için farmakolojik değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Ayrıca antimikrobiyal, hepatoprotektif etkili olduğu (Matić ve ark. 2011), antihemorajik ajan olduğu yara iyileşmesinde (Demirci ve ark. 2003) ishale karşı, mide ve duodenum ülserinde (Ivanova ve ark. 2013) kullanılabilirliği bildirilmiştir.

Fraternale ve Ricci (2014), *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinin antimikrobiyal etkisi üzerine yaptıkları bir çalışmada, bitkinin Gram (+) bakterilerden; *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ile üç *Candida* suşuna karşı etkin olduğu ancak Gram (-) bakterilerden; *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*)'ya etkin olmadığını saptamışlardır. *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinin yapraklarından elde edilen metanol ekstraktın *S.aureus* üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada *Cotinus coggygria*'nın %60'lık metanol ekstraktının zengin tanen ve flavonoid içeriğiyle antibiyofilm aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Rendeková ve ark. 2016). Kaymaz'ın (2018), yaptığı bir çalışmada *Cotinus coggygria* metanol ekstraktının güçlü antioksidan etkisinin olduğu ve enflamasyonu önleyici etkisi ile kollajen doku yapımına katkısından dolayı yara ve yanık iyileştirici özelliklerinin olduğunu belirlenmiştir.

*Aeromonas hydrophila* (*A.hydrophila*) (ATCC®7965)'ya karşı *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinden elde edilen sulu özlerin, 20 mg/ml (%44.03), 10 mg/ml (% 38.83) ve 8 mg/ml (% 36.36) konsantrasyonlarda bakteriyostatik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Stratev ve ark.2012). Sırbistan'ın Deliblatska peščara ve Zemun bölgelerinden elde edilen *Cotinus coggygria* Scop.'un genç sürgünlerinden toplanan yapraklardan Clevenger düzeneği kullanılarak esansiyel yağ elde edilmiş ve bu yağların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Bu yağların disk difüzyon yönteminde standart ilaç olarak kullanılan streptomisin'e kıyasla, Gram (+) bakterilere karşı biraz daha yüksek aktivite gösterdiği, mikrodilüsyon yönteminde ise biraz daha düşük aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, ticari fungusitolan bifonazol'den daha yüksek bir antifungal potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur (Novaković ve ark. 2007).

Matić ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinden elde edilen metanol ekstraktı ve sentetik gallik asidi, *S.aureus*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *E. coli* (ATCC® 25923), *S. aureus* (ATCC®25923), *Micrococcus lysodeikticus* (*M. lysodeikticus*) (ATCC® 4698) ve *Candida albicans* (*C. albicans*) (ATCC®10259) üzerinde test etmişler ve sonuçta *Cotinus coggygria* Scop.'un metanol ekstraktının, gallikaside göre daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Marčetić ve ark. (2013)'nin yaptıkları çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. aseton özütlünün ve türetilmiş etil asetat fraksiyonunun Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin (MİK 25-200 mg/ml) büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. Diğer bir çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinden elde edilen, etanol, metanol, distile su, kloroform, aseton ve petrol eter ekstraktlarının *S. epidermidis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *B. subtilis* üzerinde antibakteriyel etkileri araştırılmış ve *Cotinus coggygria* Scop.'tan elde edilen distile su ve metanol ekstraktları *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. faecalis* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Tunç ve ark. 2013).

Bu çalışmada, *Cotinus coggygria* Scop. bitkisinin etanol ekstraktının, Bursa Uludağ Üniversitesi Hastanesi yoğun bakımında yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) ve *K. pneumoniae* ile Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan *S. aureus* (ATCC®25923), *E. coli* (ATCC®25922) standart bakteri

suşlarına karşı antibakteriyel etkisinin disk difüzyon yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### *Cotinus coggygia* Scop. Ekstraktının Hazırlanması

Direkt güneş ışığına maruz kalmadan, normal oda koşullarında kurutulmuş olan *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin yaprakları, Bursa Uludağ Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Gıda Analiz Laboratuvarı'nda Sinbo marka parçalayıcıda toz haline getirildi. Daha sonra *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının eldesi için, toz haline getirilen *Cotinus coggygia* Scop.'tan yaklaşık 25gr örnek alınarak, gıda endüstrisinde kullanımına izin verilen bir yardımcı çözücü olan 200 ml etanol ile Soxhlet düzeneğinde dört saat boyunca ekstrakte edildi. Bunu takiben Heidolph G3 marka Rotary evaporatör yardımıyla etanol uçurularak bitkinin ham ekstraktı elde edildi. Balon içerisinde kalan ekstrakt steril ependorf tüplerine laminar flow ortamında aktarıldı. Tüpler uygulama yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edildi. Etanolde 1000 µg/ml olacak etanol de çözülerek stok solüsyon hazırlandı.

### Test Edilen Bakteriler

Bu çalışmada, bakteri türleri olarak, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından kullanımı önerilen duyarlılık özelliği bilinen kalite kontrol suşlarından *S. aureus* (ATCC®25923) ve *E. coli* (ATCC®25922) ile yoğun bakım hastalarından izole edilmiş *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* kullanılmıştır.

### *Cotinus coggygia* Scop. Ekstraktının Antibakteriyel Aktivitesi ve Duyarlılık Karşılaştırılması

Bakteriyoloji laboratuvarında *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının antibakteriyel aktivitesini belirlemek için, CLSI'nın standart disk difüzyon metodu kullanılmıştır (CLSI (2010)). Antibakteriyel duyarlılığı test edilecek olan *S. aureus*(ATCC® 25923), *E. coli*(ATCC®25922) ve yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilmiş *A. baumannii*, *K. pneumoniae* etkenleri dondurucudan (-20°C) çıkarıldı. Columbia Agar'da (Koyun kanı %5) (BD 254005) yeniden canlandırılması işlemi için ekimleri yapılarak, 37°C'de 24 saat etüve konulmuştur. Saf olarak ürettiği tespit edilen bakterilerin kolonilerinden öze ile alınarak McFarland 0.5 standart yoğunluğunda (1x10<sup>8</sup> hücre/ml) (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) standart yoğunluğunda olacak şekilde steril %0.9 NaCl solüsyonu içerisinde süspansiyonları hazırlandı. Bitki ekstraktının daha önce DMSO (Dimetil sülfoksit) da çözülerek hazırlanan 30 mg/ml 'lik konsantrasyonlarda çözelti, milipor filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Petrilere yerleştirilecek sayıda, 5 µl, 10 µl, 15 µl ve 20 µl hazırlanan çözelti, 6 mm çapındaki steril standart boş antibiyotik disklerle (Whatmann No:1) emdirilmiştir. Ayrıca kontrol için 10 µl steril %0.9 NaCl diske emdirilmiştir. Daha sonra çözücülerin uzaklaşması sağlanarak çalışmada kullanılan diskler hazırlandı. Bakteri süspansiyonları eküvyon yardımı ile üç ayrı petrikabındaki Mueller Hinton agara (BD254030) yüzeyine yayılmıştır. Bakteri süspansiyonları besiyeri yüzeyine yayılır yayılmaz 15 dakika içinde, ilk petri kabına 5 µl, 10 µl, 15 µl ve 20 µl, *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktı emdirilmiş ilk dört disk ve 10 µl steril %0.9 NaCl emdirilmiş kontrol diskleri yerleştirilmiştir. Diğer bakteri yayılmış petri kaplarına ise, *S. aureus* (ATCC®25923), *E. coli* (ATCC® 25922) için günümüzde kullanılan diğer antibiyotik diskleri olan, ampicilin (10 µg) (AM) sefazolin (30 µg) (CZ), sefuroksim (30µg) (CXM), meropenem (10 µg) (MEM), ofloksasin (5 µg) (OFX), sulfa-

metoksazol/trimetoprim (23.75/1.25 µg) (SXT), tetrasiklin (30 µg) (TE), gentamisin (10 µg) (GM) yerleştirilmiştir. *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* etkenleri için meropenem (10 µg) (MEM) yerine kolistin (10 µg) (CL) diskleri yerleştirilmiştir. Daha sonratüm petri kapları 24 saat 37°C'de etüvde inkübe edilmiştir. Süre sonunda, tüm disklerin çevresindeki inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülerek *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin ekstraktının ve standart antibiyotiklerin etki düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışma için, Etik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu tarafından etik kurul izni alınmıştır (15.11.2019 tarih ve 2019/14 no'lu karar).

## BULGULAR

Çalışmamızda *Cotinus coggygia* Scop. (Tetra) bitkisinin etanol ekstraktının yoğun bakım hastalarından izole edilmiş olan, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* (ATCC®25923), *E.coli* (ATCC®25922) standart suşları üzerine antibakteriyel etkisi test edilmiştir. *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin test edilen bakterilere karşı farklı miktarlarda uygulanan etanol ekstraktının, artan miktarlarına paralel olarak test edilen bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisinin arttığı belirlenmiştir (Tablo 1). Ayrıca yoğun bakım hastalarından izole edilen *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* etkenlerine karşı *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin etanol ekstraktının belirlenen inhibisyon zon çaplarının günümüzde kullanılan farklı antibiyotiklere göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Araştırma sırasında farklı sınıflara ait 8 antibiyotik kullanılmıştır. Kaydedilen sonuçlarda; *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*'nin test edilen 6 antibiyotiğe direnç gösterdiği, *A. baumannii* gentamisin ve kolistin'e, *K. pneumoniae*'nin ise kolistin ve ofloksasin'e karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların artması yüzünden bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi de giderek güçleşmiştir. Direnç geliştirmekte olan bakterilerin, bilinen tüm antibiyotiklere, dirençliliği artmıştır (Cesur ve Demiröz 2013). Günümüzde kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkması ve buna ilave olarak sentetik ilaçların yan etkilerinin daha fazla görülmesi nedeniyle, bilim insanları doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya yönelmiştir (Dülger ve ark.1997). Çalışmalarda tıbbî bitkilerin ilaçlara alternatif olarak kullanılması önerilmiştir. Hızla artan antibiyotik direncinin önlenmesinde tıbbi bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi tamamlayıcı tedaviye çözüm olacağı vurgulanmıştır (Singh ve ark. 2011; Gülbandır ve ark. 2017). Yapılan çalışmalarda, bitkilerin tedavi edici etkilerinin yapılarında bulunan tek bir etken maddeden çok, bileşiminde bulunan maddelerin sinerjik etkisinden kaynaklandığı, tek bir antibiyotikle öldürülmesi zor olan mikroorganizmaların dirençliliğine, bitkinin yapısında bulunan tüm bileşimlerin karşı koyarak daha etkin bir tedavi sağladığı rapor edilmiştir (Shanthi ve ark. 2010; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013). Bu durum, bilim insanlarını bitki özütlerinden elde edilen doğal antimikrobiyal ajanların bileşimlerini ve inhibitör etkilerini araştırmaya yöneltmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013).



**Tablo 1.** *Cotinus coggygia* Scop. etanol ekstraktının test edilen bakterilerde oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm)**Table 1.** Inhibition zone diameters caused by *Cotinus coggygia* Scop. ethanol extract in the bacteria tested (mm)

G. K. S. A	İnhibisyon zon çapı sınırları (mm)			Cotinus coggygia Scop. etanol ekstraktının test edilen bakterilerde oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm)															
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	<i>S. aureus</i> (ATCC® 25923)				<i>E. coli</i> (ATCC® 25922)				<i>A. baumannii</i>				<i>K. pneumoniae</i>			
				Ekstrakt miktarı (µl)				Ekstrakt miktarı (µl)				Ekstrakt miktarı (µl)				Ekstrakt miktarı (µl)			
				5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
				İnhibisyon zon çapları (mm)				İnhibisyon zon çapları (mm)				İnhibisyon zon çapları (mm)				İnhibisyon zon çapları (mm)			
AM	≥ 17	14-16	≤ 13																
CZ	≥ 23	20-22	≤ 19																
CXM	≥ 18	15-17	≤ 14																
MEM/CL	≥ 23 / ≥ 11	20-22 / -	≤ 19 / ≤ 10	12	17	19	20	9	10	12	14	7	10	13	15	10	14	16	17
OFX	≥ 16	13-15	≤ 12																
SXT	≥ 16	11-15	≤ 10																
TE	≥ 15	12-14	≤ 11																
GM	≥ 15	13-14	≤ 12																

G.K.S.A: Günümüzde Kullanılan Standart Antibiyotikler; Ampisilin (10 µg) ;(AM) Sefazolin (30 µg) (CZ); Sefuroksim (30 µg) (CXM); Meropenem (10 µg) (MEM); Ofloksasin (5 µg) (OFX); Sulfametoksazol/ trimetoprim (23.75/1.25 µg) (SXT); Tetrasiklin (30 µg) (TE); Gentamisin (10 µg) (GM); Kolistin (10 µg) (CL).

**Tablo 2.** Günümüzde kullanılan standart antibiyotiklerin test edilen bakterilerde oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm)**Table 2.** Inhibition zone diameters created by today's standard antibiotics in tested bacteria (mm)

İnhibisyon zon çapları (mm)					
Günümüzde Kullanılan Standart Antibiyotikler	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922)	Günümüzde Kullanılan Standart Antibiyotikler	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Ampisilin	28	17	Ampisilin	6	6
Sefazolin	28	21	Sefazolin	6	6
Sefuroksim	23	20	Sefuroksim	6	6
Meropenem	32	29	Kolistin	9	10
Ofloksasin	26	32	Ofloksasin	6	12
Sulfametoksazol/ Trimetoprim	29	20	Sulfametoksazol/ Trimetoprim	6	6
Tetrasiklin	25	20	Tetrasiklin	6	6
Gentamisin	20	17	Gentamisin	13	6

Bu çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. Bitkisinden elde edilen etanol ekstresinin 30 mg/ml'lik konsantrasyonlarının test edilen bakterilere karşı önemli düzeyde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza paralel olarak, Matić ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin metanol ekstraktının çalışılan tüm bakterilere karşı yüksek inhibisyon zon çapı (9-18 mm) ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada metanol ekstraktına karşı en fazla inhibisyon zon çapı *E. coli*'ye karşı elde edilirken, bizim çalışmamızda ise *S. aureus*'ta en fazla inhibisyon çapı elde edilmiştir. Yine Matić ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada sırasıyla 150 µg ve 300 µg olarak *E. coli*'ye uygulanan metanol

ekstraktına karşı inhibisyon zon çapı 29 mm ve 17 mm bulunmuş ve artan konsantrasyonla bizim çalışmamızdan farklı olarak inhibisyon zon çaplarının ters orantı gösterdiği bildirilmiştir. Tunç ve ark. (2013)'ün altı farklı çözücü ile elde ettikleri *Cotinus coggygia* Scop. Bitkisinin ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak; *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinden elde edilen aseton, etanol, metanol ve distile su ekstraktlarının, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis*'e; etanol ve metanol ekstraktlarının *E. coli*'ye bizim çalışmamızda olduğu gibi *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Tunç ve ark. (2013)'ün *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin etanol ekstraktının, çalışmamızda olduğu gibi artan

konsantrasyonlarda (1,600/ 30 µl, - 200/30µl) *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı inhibisyon zon çaplarının arttığını bulmuşlardır. Ancak bizim araştırmamızda her iki etkene karşı daha 30 mg/ml 'lik konsantrasyonlarda daha düşük miktardaki hacimlerde (5µl-20 µl) daha fazla antibakteriyel etki saptanmıştır. Bektaş (2011) yaptığı bir çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinden elde ettiği aseton, etanol ve su ekstraktlarının 5 farklı bakteri (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*) ve 2 farklı *Candida* türü (*C. albicans*, *C. crusei*) üzerindeki antimikrobiyal etkisini disk difüzyon yöntemini uygulayarak belirlemiştir. Bektaş (2011)'in yaptığı çalışmada özellikle test edilen 5 bakteriden sadece *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı etkin inhibisyon zon çapları gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise, *E. coli* ve *S. aureus*'a ilave olarak ve *K. pneumoniae*'ye karşıda antibakteriyel etki saptanmıştır.

Her iki araştırmada da *S. aureus*'ta sentetik antibakteriyellerden ampisiline direnç saptanmıştır. Marçeti ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin genç sürgünlerinden elde edilen aseton, kloroform, etil asetat fraksiyonu ve su fraksiyonu ekstraktlarını *S. aureus* (ATCC®25923), *S. epidermidis* (ATCC®12228), *Micrococcus luteus* (ATCC®9341), *E. faecalis* (ATCC® 29212), *B. subtilis* (ATCC®6633), *P. aeruginosa* (ATCC®27853), *E. coli* (ATCC®25922), *K. pneumoniae* (NCIMB 9111), *C. albicans* (ATCC® 10259) ve *C. albicans* (ATCC®24433) üzerinde test etmişlerdir. Çalışmada bizim araştırmamızda olduğu gibi, *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin dirençli Gram (-) bakteri suşlarının büyümesini önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Ulukanlı ve ark. (2014), çalışmalarında *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin yapraklarında bulunan α-pinen, limonen ve β-myrisinin *S. aureus* gibi yanıkta enfeksiyondan ve enflamasyonun artışından sorumlu bakterilere karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir. Shagun ve ark. (2016)'nın, yaptığı bir çalışmada küçük cilt enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* karşı çalışmamızda olduğu gibi güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği belirtilmiştir. Akgül ve Öztürk (2014)'ün yaptığı çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. bitkisine ait ekstraktların idrar yolu enfeksiyonlarında *Pseudomonas* spp. ve *Klebsiella* spp. izolatlarına karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya antibakteriyel etki gösterdiği, *E. coli*'ye karşı ise ekstraktın etkin olmadığını bildirmiştir (Borchardt ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda ise aksine *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının *E. coli*'ye güçlü antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, ülkemizde endemik bulunan ve Dünya'da çeşitli yörelerde geleneksel halk ilaçları arasında kullanılmakta olan *Cotinus coggygia* (Tetra) Scop. bitkisi önemli bir uçucu yağ kaynağıdır. Mevcut yapılan çalışmada da antibakteriyel etkinlik ortaya konulmuştur. Ekstrakt özellikle yoğun bakımda yatan hastalarından izole edilen poli-dirençli suşlarda (*K. pneumoniae* ve *A. baumannii*) da bakterisidal aktivite göstermiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak, *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde gösterdiği antibakteriyel etki ile tıpta, sağlık hizmetlerinde ve çeşitli endüstriyel alanlarda, umut verici terapötik potansiyele sahip doğal ajanlar arasında sıralanabileceği düşüncesindeyiz.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.





## KAYNAKLAR

- Akgül Y, Öztürk Ş (2014). İdrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarına karşı bazı bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Al Johani SM, Akhter J, Balkhy H, El-Saed A, Younan M, Memish Z (2010). Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med*, 30(5), 364-369.
- Ballabh B, Chaurasia OP (2007). Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh—used in treatment of cold, cough and fever. *J Ethnopharmacol*, 112 (2), 341-349.
- Bektaş E (2011). *Cotinus coggygia* (Scop.) bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, Trakya Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC et al. (2008). Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *J Med Plant Res*, 2(5), 98-110.
- Centres for Disease Control and Prevention (US) (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services.
- Cesur S, Demiröz AP (2013). Antibiotics and the mechanisms of resistance to antibiotics. *Med J Islamic World Acad Sci*, 21(4), 138-142.
- Chitme HR, Chandra R, Kaushik S (2004). Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. in experimental animals. *J Pharm Pharm Sci*, 7(1), 70-75.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement, M100-S20, CLSI, Wayne, PA.
- Demirci B, Demirci F, Başer KHC (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* Scop. from Turkey. *Flavour Frag J*, 18(1), 43-44.
- Dülger B, Gücin F, Malyer H, Bıçakçı A (1997). Antimicrobial activity of Marigold (*Tagetes Minuta* L.). *ACTA Pharm Sci*, 39(3), 115-118.
- Erdoğan AE, Everest A (2013). Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilim Derleme Derg*, 6(2), 27-32.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu M (2013). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. Erzurum Üniv. *Fen Bil Enst Dergisi*, 6(2), 233-265.
- Fraternali D, Ricci D (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cotinus coggygia* Scop. from Italy. *J Essent Oil Bear Pl*, 17(3), 366-370.
- Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391-415.
- Gülbandılar A, Okur M, Öztop N, Dönmez M (2017). Dumlupınar Üniversitesi Altıntaş Meslek Yüksekokulu öğrencilerinin antibiyotiklerle tedavi konusunda bilgi ve tutumlarının belirlenmesi. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2), 581-585.
- Haddad-Kashani H, Seyed-Hosseini E, Nikzad H, Aarabi M H (2012). Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolite. *Life Sci J*, 9(1), 509-520.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35(4), 322-332.
- Ivanova DG, Pavlov DV, Eftimov M et al. (2013). Subchronic toxicity study of ethanol infusion from *Cotinus coggygia* wood in rats. *Bulg J Agric Sci*, 19(2), 182-185.
- Kaymaz MB (2018). Yanık yarası üzerine *Cotinus coggygia* (duman ağacı) yaprak ekstresi ve fenitoinin etkileri, İnönü Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Kiffer CR, Mendes C, Oplustil CP, Sampaio JL (2007). Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from a major urban city. *International Braz J Urol*, 33(1), 42-49.
- Marçetić M, Božić D, Milenković M, Malešević N, Radulović S, Kovačević N (2013). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygia* Scop. *Phytother Res*, 27(11), 1658-1663.
- Matić S, Stanić S, Solujić S, Milošević T, Niciforović N (2011). Biological properties of the *Cotinus coggygia* methanol extract. *Period Biol*, 113(1), 87-92.
- Ngule CM, Swamy A (2013). Phytochemical and bioactivity evaluation of *Senna didymobotrya* Fresen Irwin used by the Nandi community in Kenya. *Int J Bioassays*, 2(7), 1037-1043.
- Novaković MM, Vučković IM, Janačković PT et al. (2007). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygia* from Serbia. *J Serb Chem Soc*, 72(11), 1045-1051.
- Rendeková K, Fialová S, Jánošová L, Mučaji P, Slobodníková L (2016). The activity of *Cotinus coggygia* Scop. leaves on *Staphylococcus*

- aureus strains in planktonic and biofilm growth forms. *Molecules*, 21(1), 50-59.
- Roberts MC (2005).** Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 245(2), 195-203.
- Shagun S, Sujata B, Manjul S (2016).** Chemical profiling, antioxidant and antibacterial properties of *Cotinus coggygia* essential oil from Western Himalaya. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 8(7), 1183-1186.
- Shanthi Sree, KS, Yasodamma N, Paramageetham CH (2010).** Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastianiachamaelea Müell Arg The Bioscan*, 5, 173-5.
- Singh B, Dutt N, Kumar D, Singh S, Mahajan R (2011).** Taxonomy, ethnobotany and antimicrobial activity of *Croton bonplandianum*, *Euphorbia hirta* and *Phyllanthus fraternus*. *Journal of Advances in Developmental Research*, 2(1), 21-29.
- Stratev D, Dinkov D, Vashin I (2012).** Antibacterial effect of extracts from Bulgarian's "poplar" propolis and Smoke tree (*Cotinus coggigria* Scop.) against *Aeromonas hydro-phila* (ATCC 7965). *Revue Méd Vét*, 163(10), 443-447.
- Thomas MB, Singh S (2013).** Review article on antimicrobial resistance. *Indian J Biotech Pharm Res*, 1(2), 223-225.
- Tunç K, Hos A, Günes B (2013).** Investigation of antibacterial properties of *Cotinus coggygia* from Turkey. *Pol J Environ Stud*, 22(5), 1559-1561.
- Tzakou O, Bazos I, Yannitsaros A (2005).** Essential oils of leaves, inflorescences and infructescences of spontaneous *Cotinus coggygia* Scop. from Greece. *Flavour Frag J*, 20(5), 531-533.
- Ulukanlı Z, Karabörklü S, Bozok F, Çenet M, Öztürk B, Balcılar M (2014).** Antimicrobial, insecticidal and phytotoxic activities of *Cotinus coggygia* Scop. essential oil (Anacardiaceae). *Nat Prod Res*, 28(23), 2150-2157.
- Westenburg HE, Lee KJ, Lee SK et al. (2000).** Activity-Guided Isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygia*. *J Nat Prod*, 63(12), 1696-1698.
- WHO (2014).** Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.
- Wright GD (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(10), 1451-1470.



## Evaluation of Some Clinical, Hematological and Biochemical Parameters in Healthy Gurcu Bucks and Does

Enes AKYÜZ<sup>1</sup>  Ali Haydar KIRMIZIGÜL<sup>1</sup>  Mushap KURU<sup>2</sup>  Mert SEZER<sup>1</sup>   
Taygun GÖKDEMİR<sup>3</sup>  Yusuf Umut BATI<sup>1</sup>  Amir NASERİ<sup>4</sup>  Gürbüz GÖKÇE<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kars, Turkey

<sup>2</sup> Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Kars, Turkey

<sup>3</sup> Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Kars, Turkey

<sup>4</sup> Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Konya, Turkey

Received: 26.06.2020

Accepted: 05.09.2020

### ABSTRACT

The aim of the study is to evaluate some hematological parameters in healthy Gurcu bucks and female Gurcu goats. The number of studies in this area is very low. In the study, healthy, 2-4 years old, 15 male and 15 female animals were used. From the animals in the study, 10 mL blood samples were taken with the help of holder from *vena jugularis* and transferred to K<sub>3</sub>EDTA and gel tubes. Complete blood count was measured in a complete blood count device within 30 minutes. Total leukocyte (WBC) was determined as 11.95 x10<sup>3</sup>/μL in females and 8.18 x10<sup>3</sup>/μL in males. Hemoglobin was measured as an average of 7.32 g/dL in females and 8.75 (g/dL) in males. The total protein concentration was determined as an average of 7.40 g/dL in females, 7.26 g/dL in males and a total average of 7.33 g/dL. In addition, the total average concentrations of creatinine, urea nitrogen, albumin, calcium, phosphorus, magnesium and glucose, respectively; 0.66 mg/dL, 25.92 mg/dL, 2.56 g/dL, 8.62 mg/dL, 4.37 mg/dL, 2.77 mEq/L and 47.04 mg/dL. As a result, some blood parameters of healthy Gurcu bucks and does that are traditionally pasture feeding were determined and reference values were obtained with this study.

**Keywords:** Albumin, Calcium, Creatinine, Glucose, Gurcu bucks, Gurcu does, Hematology

### ÖZ

## Sağlıklı Gürcü Teke ve Keçilerinde Bazı Klinik, Hematolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

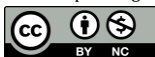
Çalışmanın amacı, sağlıklı erkek Gürcü teke ve dişi Gürcü keçilerinde bazı hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu alanda yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Yapılan çalışmada sağlıklı, 2-4 yaşlı, 15 erkek ve 15 dişi hayvan kullanılmıştır. Çalışmadaki hayvanlardan bir defa *vena jugularis'ten* holder yardımıyla 10 mL kan örnekleri alınıp K<sub>3</sub>EDTA'lı ve jelli tüplere aktarılmıştır. Tam kan sayımı 30 dakika içerisinde tam kan sayım cihazında ölçülmüştür. Total lökosit dişilerde ortalama 11,95 x10<sup>3</sup>/μL, erkeklerde 8,18 x10<sup>3</sup>/μL olarak belirlenmiştir. Hemoglobin dişilerde ortalama 7,32 g/dL, erkeklerde 8,75 g/dL olarak ölçülmüştür. Total protein konsantrasyonu dişilerde ortalama 7,40 g/dL, erkeklerde 7,26 g/dL ve toplam ortalama 7,33 g/dL olarak belirlenmiştir. Ayrıca kreatinin, üre nitrojen, albümin, kalsiyum, fosfor, magnezyum ve glikoz toplam ortalama konsantrasyonları sırasıyla; 0,66 mg/dL, 25,92 mg/dL, 2,56 g/dL, 8,62 mg/dL, 4,37 mg/dL, 2,77 mEq/L ve 47,04 mg/dL olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile geleneksel olarak mera beslemesinin yapıldığı sağlıklı Gürcü teke ve keçilerinin bazı kan parametreleri belirlenerek referans değerler elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Albümin, Kalsiyum, Kreatinin, Glikoz, Gürcü teke, Gürcü keçi, Hematoloji

### INTRODUCTION

Gurcu goat is known today as Tiflis goat or Kafkas goat and originated from Caucasian breeds (Batu 1951, Kuru et al. 2017a). Nowadays, it is especially breeding in some

provinces of Eastern Anatolia. The Gurcu goat is phenotypically similar to the Abaza goat raised in the Artvin region, Turkey (Batu 1951, Kuru et al. 2017b, Kuru et al. 2018). Previous studies revealed that genders and ages of animals can be lead to significant differences in the



biochemical and hematological parameters (Naresk et al. 1997, Iriadam 2004, Kaneko et al. 2008). In addition, different nutritional conditions can cause differences in hematological and biochemical values (Akyuz et al. 2020). Determination of the biochemical and hematological levels is important to specify the patients' health status and follow-up the diseases (Meyer and Harvey 2004, Gürgöze and Gökalp 2018). Breed can effective on hematological and biochemical values in farm animals. Accordingly, the effects of different factors such as the breed and gender on blood values were investigated in the goats (Tanrıtanır et al. 2010, Piccione et al. 2012, Piccione et al. 2014, Balamurugan et al. 2015, Barwary et al. 2016, Madan et al. 2016, Gürgöze and Gökalp 2018). Some blood parameters may give different results between goat breeds, and this may be due to other factors such as environment and altitude (Er and Ok 2020). Hematological evaluations of Gurcu bucks and does were not found in the literature searches. Kuru et al. (2017a) conducted research on the reproductive properties of Gurcu goats. Akyüz et al. (2020) examined the levels of biochemical parameters such as glucose, lactate dehydrogenase, triglyceride, total protein, calcium, aspartate aminotransferase, magnesium, low density lipoprotein in Gurcu goats during different feeding periods. In this study, it is aimed to determine some clinical, hematological, and biochemical parameters in the traditionally fed Gurcu bucks and does. We think that this study will obtain important data on healthy Gurcu bucks and does.

## MATERIALS and METHODS

This study was carried out after the approval (KAU-HADYEK 2020-079) received from Kafkas University Animal Experiments Local Ethics Committee.

The study included clinically healthy Gurcu does (n=15) between the ages of 2-4, not lactating and found to be not pregnant by transrectal ultrasonography, and Gurcu bucks (n=15) between the ages of 2-4, clinically healthy and found to have normal andrological and examination findings. The study was carried out on the bucks and does under the routine feeding conditions at Kafkas University Veterinary Faculty Education, Research, and Application Farm. The rectal temperatures, heart rate, and respiratory rate of the animals were recorded. Ten milliliters of blood was collected by *vena jugularis* venipuncture and amount of 8 milliliters placed in tubes without anticoagulant (BD Vaktainer®, BD, UK) allowed to clot, and centrifuged at 2000 x g for 10 minutes (Hettich Rotina 380R®, Hettich, Germany). After extraction, glucose (mg/dL), calcium (mg/dL), total protein (g/dL), albumin (g/dL), magnesium (mEq/L), phosphorus (mg/dL), urea nitrogen (mg/dL), creatine (mg/dL) concentrations were measured by fully automatic biochemistry device (Mindray BS120®, Mindray Medical Technology, Istanbul, Turkey). Remaining the 2 mL was used for complete blood cell count (CBC) analysis. For CBC analysis, tubes containing K<sub>3</sub>EDTA were used and after sample collection, the analysis was immediately made by a CBC analyser (VG-MS4e®, Melet Schloesing, France) within 30 minutes.

### Statistical analysis

Statistical analysis of the data was done using SPSS® (SPSS 18.0, Chicago, IL, USA) program. In the first step of the statistic evaluation, normality of data distribution was tested by Shapiro-Wilk test. Normally distributed data were analyzed using Independent Samples T-Test. If the data was not normally distributed, data were analyzed by nonparametric Mann-Whitney U tests. Data were

presented as means ± standard error (SEM) and min-max values. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Our results showed that total leukocytes, monocytes, lymphocytes, granulocytes, and platelets were significantly higher in does than bucks. Also, the hematocrit, percent of the granulocytes, and mean platelet volumes were significantly higher in the bucks compare to does (Table 1). Total leukocytes were higher in Gurcu does than Gurcu bucks ( $p < 0.001$ ). Monocytes, lymphocytes, granulocytes counts were found higher in females than males at statistical significance level ( $p < 0.001$ ). On the contrary, the percentage of hematocrit was found to be lower in females compared to males ( $p < 0.001$ ). In addition, platelet count and platelet percentage were higher in females than males ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences in the clinical data and serum biochemistry parameters between does and bucks (Table 2). While glucose, total protein, urea nitrogen, creatinine, calcium, phosphorus levels were found higher in females than males, albumin and magnesium levels were found to be low ( $p > 0.05$ ). The hematological, biochemical, and clinical data of all goats (male and female) irrespective of gender were presented in Table 3.

## DISCUSSION

In animals, many features such as environmental factors, geography, gender, age, nutrition and breed cause significant differences in hematological and biochemical parameters (Bhargava 1980, Iriadam 2004, Kaneko et al. 2008, Akyuz et al. 2020). In a study on Kilis goats by Iriadam (2004) total leukocyte, red blood cell, hemoglobin, hematocrit, mean red blood cell hemoglobin concentration, and lymphocyte percentage found to be higher than the results of our study. On the contrary, the average hemoglobin volume, mean red blood cell hemoglobin, granulocyte, and monocyte percentages reported to be lower. It was thought that these differences in blood values could be caused by genetics and environmental factors such as different diet patterns and altitude. In our study, hematological parameters such as total leukocyte, red blood cell count, hemoglobin concentration were found in the reference ranges and it was parallel to the results of the previous study performed by the Jackson and Cockcroft (2002). In addition, our findings showed that the total leukocyte, monocyte, and granulocyte values were found to be higher in females than males, while the low hematocrit value seen in the female gender ( $p < 0.001$ ). These findings may be indicated that gender can be affecting some hematological parameters (Bhargava 1980, Iriadam 2004, Kaneko et al. 2008). We think that changes in blood parameters may occur as a result of the effect of hormonal balance changing depending on the gender. Er and Ok (2020) reported that some blood parameters may be affecting by environmental factors such as altitude. Kaneko et al (2008) have been demonstrated that some hematological parameters such as red blood cell count, hemoglobin concentration, and hematocrit percentage can be affected by altitude and environmental factors. It was concluded that the pressure of the atmosphere decreases as it rises higher and the oxygen molecules in it become sparse, so blood levels may vary depending on the altitude. Therefore, Iriadam (2004), Irak et al. (2017) and so on the

results obtained from our study showed that the number of red blood cells, hemoglobin concentration and the percentage of hematocrit, were found to be different from

each other although they were determined between reference values depending on the effect of both environmental factors and breeds.

**Table 1.** Hematological values of female and male goats in the study

Parameters	Gender	Mean value	Standart error	Minimum value	Maximum value	P value
<b>Total leukocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	Female	11.96	0.32	10.50	14.03	<0.001
	Male	8.19	0.11	7.49	8.71	
<b>Lymphocytes (%)</b>	Female	57.92	1.94	52.40	75.00	0.232
	Male	51.45	4.93	46.10	63.90	
<b>Monocytes (%)</b>	Female	14.31	0.90	6.40	17.20	<0.001
	Male	7.65	0.24	6.20	8.90	
<b>Granulocytes (%)</b>	Female	27.77	1.21	18.60	33.90	0.002
	Male	33.57	1.25	28.80	44.20	
<b>Lymphocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	Female	6.96	0.41	5.75	10.52	<0.001
	Male	4.82	0.15	3.62	5.46	
<b>Monocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	Female	1.67	0.09	0.89	2.00	<0.001
	Male	0.62	0.02	0.53	0.73	
<b>Granulocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	Female	3.30	0.13	2.62	4.17	0.001
	Male	2.75	0.08	2.32	3.32	
<b>Red blood cell count (x10<sup>6</sup>/μL)</b>	Female	14.22	0.46	12.43	18.13	0.350
	Male	18.46	0.29	16.72	19.93	
<b>Mean red cell volume (fL)</b>	Female	21.63	0.34	18.90	23.00	0.488
	Male	21.34	0.25	19.40	22.30	
<b>Hematocrit (%)</b>	Female	30.56	0.76	26.70	35.10	<0.001
	Male	39.42	1.06	32.40	44.20	
<b>Mean erythrocyte hemoglobin (pg)</b>	Female	6.17	0.11	5.50	6.60	0.074
	Male	6.48	0.13	5.42	6.90	
<b>Mean erythrocyte hemoglobin volume (g/dL)</b>	Female	28.71	0.34	26.20	30.90	0.450
	Male	26.79	2.45	23.50	31.20	
<b>Erythrocyte distribution width (fL)</b>	Female	12.78	7.52	11.10	14.50	0.345
	Male	12.55	0.23	11.50	14.20	
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	Female	7.32	0.80	6.10	10.10	0.360
	Male	8.75	1.32	7.20	11.50	
<b>Platelet count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	Female	370.80	29.21	167.00	509.00	0.014
	Male	287.60	6.00	250.00	318.00	
<b>Mean platelet volume (fL)</b>	Female	4.60	0.04	4.40	4.80	<0.001
	Male	4.83	0.03	4.60	5.00	
<b>Platelets (%)</b>	Female	0.17	0.01	0.08	0.22	0.045
	Male	0.14	0.01	0.12	0.15	
<b>Platelet distribution width (fL)</b>	Female	6.84	0.16	6.20	8.20	0.360
	Male	7.01	0.08	6.50	7.50	

**Table 2.** Clinical and biochemical data of male and female goats in the study

Parameters	Gender	Mean value	Standard error	Minimum value	Maximum value	P value
<b>Body temperature (°C)</b>	Female	38.46	0.14	37.20	39.20	0.234
	Male	38.25	0.09	37.60	38.70	
<b>Pulse rate per minute</b>	Female	91.00	3.63	72.00	120.00	0.836
	Male	90.13	2.01	76.00	96.00	
<b>Respiratory rate per minute</b>	Female	28.33	1.41	22.00	36.00	0.534
	Male	29.33	0.72	24.00	32.00	
<b>Glucose (mg/dL)</b>	Female	48.04	1.99	31.77	59.18	0.588
	Male	46.05	3.04	30.93	65.73	
<b>Total Protein (g/dL)</b>	Female	7.40	0.13	6.32	7.96	0.529
	Male	7.26	0.19	6.23	8.23	
<b>Albumin (g/dL)</b>	Female	2.49	0.08	1.94	3.01	0.326
	Male	2.64	0.12	1.84	3.63	
<b>Blood urea nitrogen (mg/dL)</b>	Female	26.11	1.04	20.03	32.09	0.784
	Male	25.73	0.94	20.34	31.09	
<b>Creatinine (mg/dL)</b>	Female	0.68	0.05	0.45	1.10	0.536
	Male	0.64	0.04	0.42	0.92	
<b>Calcium (mg/dL)</b>	Female	8.78	0.22	7.14	9.62	0.383
	Male	8.47	0.28	6.28	9.60	
<b>Magnesium (mg/dL)</b>	Female	2.72	0.08	2.04	3.18	0.229
	Male	2.83	0.04	2.62	3.09	
<b>Phosphorus (mg/dL)</b>	Female	4.41	0.13	3.63	5.13	0.722
	Male	4.35	0.12	3.57	5.32	

**Table 3.** Hematological, biochemical and physical data of all goats in the study

Parameters	Mean value	Standard error	Minimum value	Maximum value
<b>Total leukocyte count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	10.07	0.39	7.49	14.03
<b>Lymphocytes (%)</b>	54.69	2.67	46.10	75.00
<b>Monocytes (%)</b>	10.98	0.77	6.20	17.20
<b>Granulocytes (%)</b>	30.67	1.01	18.60	44.20
<b>Lymphocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	5.89	0.29	3.62	10.52
<b>Monocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	1.15	0.11	0.53	2.00
<b>Granulocytes count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	3.03	0.09	2.32	4.17
<b>Red blood cell count (x10<sup>6</sup>/μL)</b>	16.34	0.48	12.43	19.93
<b>Mean red cell volume (fL)</b>	21.49	0.21	18.90	23.00
<b>Hematocrit (%)</b>	34.99	1.04	26.70	44.20
<b>Mean erythrocyte hemoglobin (pg)</b>	6.32	0.09	5.50	6.90
<b>Mean erythrocyte hemoglobin volume (g/dL)</b>	27.75	1.23	23.50	31.20
<b>Erythrocyte distribution width (fL)</b>	12.66	3.76	11.10	14.50
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	8.04	0.77	6.10	11.50
<b>Platelet count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	329.20	16.56	167.00	509.00

Mean platelet volume (fL)	4.71	0.03	4.40	5.00
Platelets (%)	0.15	0.01	0.08	0.22
Platelet distribution width (fL)	6.92	0.09	6.20	8.20
Body temperature (°C)	38.36	0.09	37.20	39.20
Pulse rate per minute	90.57	2.04	72.00	120.00
Respiratory rate per minute	28.83	0.78	22.00	36.00
Glucose (mg/dL)	47.05	1.80	30.93	65.73
Total Protein (g/dL)	7.33	0.11	6.23	8.23
Albumin (g/dL)	2.56	0.07	1.94	3.63
Blood urea nitrogen (mg/dL)	25.92	0.69	20.03	32.09
Creatinine (mg/dL)	0.66	0.03	0.45	1.10
Calcium (mg/dL)	8.62	0.17	6.28	9.62
Magnesium (mg/dL)	2.77	0.05	2.04	3.18
Phosphorus (mg/dL)	4.38	0.09	3.67	5.12

The glucose concentration was measured as 53.88 mg/dL and 44.44 mg/dL in Angora and Aleppo does, respectively (Gürgöze and Gökalp 2018). Additionally, glucose concentration was found to be 80.33 mg/dL in Baladi bucks (Abd El-Maksoud et al. 2012). In the presented study, the mean (does and bucks) glucose concentration was determined as 47.04 mg/dL. The mean glucose concentration of bucks was measured as 46.05 mg/dL. The bucks glucose concentration in our study may have found different from Abd El-Maksoud et al. (2012) for reasons such as care, breed, nutrition, altitude, environmental factors. The average glucose concentration obtained in our study was found to be compatible with the literature (Gürgöze and Gökalp 2018). The reference values of total protein were reported to vary between 6.2–7.9 g/dL in goats (Jackson and Cockcroft 2002). Total protein and albumin concentration in female Saanen goats were reported as 7.40 g/dL and 3.73 g/dL, respectively (Marutsova and Binev 2020). Average total protein concentration in the Gaddi goats was determined as 9.41 g/dL (Naresk et al. 1997), and 8.65 g/dL in the Kilis goats (Iriadam 2004). In the present study, the total protein concentration was determined as 7.40 g/dL in does, 7.26 g/dL in bucks, and irrespective of the gender was 7.33 g/dL. These values for goats were found in the reference ranges stated by Jackson and Cockcroft (2002). Although the total protein level in our study is within normal limits, we think that differences may occur depending on breed and gender. Mean albumin concentration was found to be 2.56 g/dL in our study, and it was lower than the results stated by the Marutsova and Binev (2020). As mentioned in the literature, different concentrations of total protein and albumin may originate from the breed properties (Bhargava 1980, Iriadam 2004, Kaneko et al. 2008). Er and Ok (2020) have been determined the average creatine concentration as 0.56 mg/dL and the urea nitrogen concentration as 24.23 mg/dL in healthy goats. In our study, these values were 0.66 mg/dL and 25.92 mg/dL for creatinine and urea nitrogen respectively and it was similar to the values reported by Jackson and Cockcroft (2002). Calcium, magnesium, and phosphorus concentrations were determined as 9.99 mg/dL, 4.39 mg/dL, and 5.94 mg/dL, respectively in the one-year-old Baladi goats (Abd El-Maksoud et al. 2012). In our study,

the mean calcium, magnesium, and phosphorus concentrations of both male and female goats were determined as 8.62 mg/dL, 2.77 mg/dL, and 4.37 mg/dL, respectively. Also, in the male gender, these values were measured as 8.46 mg/dL, 2.83 mg/dL, 4.34 mg/dL, respectively. Abd El-Maksoud et al. (2012) found that calcium, magnesium, and phosphorus concentrations of the bucks were higher than our results. Significant differences in the biochemical parameters may have been caused by many factors such as the gender and age (Naresk et al. 1997, Iriadam 2004, Kaneko et al. 2008).

## CONCLUSION

The origin of the Gurcu goats is the Caucasus and this local breed has been adapted to the harsh climatic conditions. In the present study, some clinical, hematological and biochemical parameters of the Gurcu goats were evaluated. Our results reveal that gender is an effective factor in the measured parameters. In light of the present study, the characteristics of this breed goat will be better understood. With this study, the physiological limits of the hematological and biochemical parameters of the Gurcu goat will be better understood.

## CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Abd El-Maksoud HAA, Tahia E, Ahmed El-Kharadly WA (2012). Biochemical alterations of experimentally induced hypomagnesaemia in male baladi goats. *BVMJ*, 23 (1), 19-25.
- Akyüz E, Ölmez M, Kuru M, Merhan O, Makav M, Ögün M, Bozukluhan K, Naseri A, Uzlu E, Gökce G (2020). Dişi gürcü keçilerinde mera öncesi, merada ve mera sonrası dönemde bazı biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 13 (1), 33-38.
- Balamurugan R, Durgalakshmi R, Sheeba A (2015). Effect of gender on certain serum biochemical parameters of desi goats in cauvery delta region. *J Anim Nutr and Physiol*, 1, 34-36.
- Barwary MS, Alkass JE, Ahmed SJ (2016). Studies on the effect of selenium and vitamines on some haematological and biochemical parameters in female meriz goats. *J Univ Duhok Agri Vet Sci*, 19 (1), 210-215.



- Batu S (1951)**. Türkiye Keçi Irkları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, Türkiye.
- Bhargava SC (1980)**. Haematological studies in goats. *Indian Vet J*, 57, 485-486.
- Er C, Ok M (2020)**. Determination the levels of some biochemical parameters in female hair goats in çukurova region. *Kocatepe Vet J*, 13 (1), 25-29.
- Gürgöze S, Gökalp E (2018)**. Şanlıurfa yöresi Ankara tiftik ve halep keçi ırklarına ait bazı biyokimyasal kan parametreleri ile malondialdehit düzeylerinin tespiti. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, Özel Sayı, 19-23.
- Irak K, Karakoç Z, Mert H, Çelik ÖY, Akgül G, Mert N (2017)**. Relationship between blood iron levels and some liver enzymes and histology in hairy goat crossbred. *Van Vet J*, 28 (3), 145-149.
- İriadam M (2004)**. Kilis keçilerine ait bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51, 83-85.
- Jackson P, Cockcroft P (2002)**. Clinical examination of farms animals. Blackwell Science Ltd, Malden, USA.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (2008)**. Clinical biochemistry of domestic animals. 6<sup>th</sup> (Ed), Academic Press, San Diego.
- Kuru M, Boğa Kuru B, Kulaksız R, Arı UÇ, Oral H (2017a)**. Gürcü keçilerinin bazı reproduktif özellikleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (2), 119-125.
- Kuru M, Boğa Kuru B, Kulaksız R, Arı UÇ, Oral H (2017b)**. Abaza keçilerinde progesteron destekli östrus senkronizasyonunun bazı reproduktif parametrelere etkileri. *Kocatepe Vet J*, 10 (3), 164-171.
- Kuru M, Kulaksız R, Oral H (2018)**. Determination of gestational age by measuring defined embryonic and fetal parameters with ultrasonography in abaza and gurcu goats. *Acta Vet Brno*, 87 (4), 357-362.
- Madan J, Sindhu S, Gupta M, Kumar S (2016)**. Hematobiochemical profile and mineral status in growing beetal goats kids. *J Cell Tissue Res*, 16 (1), 5517-5522.
- Marutsova VJ, Binev RG (2020)**. Changes in blood enzyme activities and some liver parameters in goats with subclinical ketosis. *Bulg J Vet Med*, 23 (1), 70-79.
- Meyer DJ, Harvey JW (2004)**. Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis, 3<sup>rd</sup> (Ed), WB Saunders Company, Philadelphia.
- Naresk K, Rastogi SK, Singh SP, Tyagi SK, Kumar N (1997)**. Variation in leucocytic count some plasma biochemical constituents due to age and sex in gaddi goats. *Indian J Anim Sci*, 67, 312-313.
- Piccione G, Messina V, Vazzana I, Dara S, Giannetto C, Assenza A (2012)**. Seasonal variations of some serum electrolyte concentrations in sheep and goats. *J Comp Clin Pathol*, 21, 911-915.
- Piccione G, Monteverde V, Rizzo M, Vazzana I, Assenza A, Zumbo A, Niutta PP (2014)**. Reference intervals of some electrophoretic and haematological parameters in Italian goats, comparison between girentana and aspromontana Breeds. *J Appl Anim Res*, 42 (4), 434-439.
- Tanrıtanır P, Ceylan E, Dede S (2010)**. Sağlıklı Siirt kıl keçilerinde doğum öncesi ve doğum sonrası bazı kan parametrelerinin araştırılması. *YYU Vet Fak Derg*, 21 (2), 103-105.



## Immunohistochemically Investigation of the Effect of Repeated Doses of GnRH on Oestrogen $\alpha$ and Progesterone B Receptors in Rats

Sema USLU<sup>1</sup>  Mecit YÖRÜK<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Burdur, Turkey

<sup>2</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Van, Turkey

Received: 16.10.2020

Accepted: 04.11.2020

### ABSTRACT

The present study aimed to determine the effect of repeated doses of GnRH injection on the distribution of estrogen and progesterone receptors. In the study (n = 24) rats were used. Trial groups; control group with placebo injection (n = 6), Group 1 (n = 6) with single GnRH injection, Group 2 (n = 6) with 5 consecutive days of GnRH, Group 3 with repeated doses of GnRH for 10 days (n = 6) randomly divided into 4 groups. At the end of the application, the ovary and uterus were removed from the sacrificed rats and the histological tissue was blocked after the follow-up procedure. The cut tissues were examined immunohistochemically in terms of estrogen, progesterone receptor distribution, and staining intensity. When ovaries are evaluated in control and 1 group; Estrogen  $\alpha$  receptors were seen as (+) in granulosa cells in follicles, primary, secondary and graaf in granulosa cells in follicle wall. (+) Reactions were detected in germinative epithelium, vascular wall endothelial cells, smooth muscle cells and interstitial cells. In the tissue samples taken from the corn and corpus uteri sections, (+) reactions were observed in the endometrial epithelium. In groups 2 and 3, reactions with different intensity in terms of staining intensity were detected in similar settlements in the ovary. Progesterone B receptors; It was observed that corpus luteum luteal cells, germinative epithelium, theca interna / externa cells showed positive reactions in groups 1, 2, 3 and 4, and the intensity of staining varied between groups. While (+) reactions were detected in the endometrium epithelium, stratum basalis region, myometrium, and perimetrium in the corn and corpus uterus, no (+) reaction was detected in the myometrium region in the control group samples.

**Keywords:** Immunohistochemical, Oestrogen receptor  $\alpha$ , Ovary, Progesterone receptor B, Uterine

### öz

## Ratlarda Tekrarlayan Dozlarda GnRH uygulamasının, Östrojen $\alpha$ ve Progesteron B Reseptörlerine Etkisinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

Sunulan bu çalışma da, tekrarlayan dozlarda GnRH enjeksiyonunun östrojen ve progesteron reseptörlerinin dağılımına etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada (n=24) adet rat kullanıldı. Gruplar; hiçbir uygulama yapılmayıp placebo enjeksiyonu yapılan kontrol grubu (n=6), tek GnRH enjeksiyonu yapılan Grup 1 (n=6), 5 gün üst üste GnRH enjeksiyonu yapılan Grup 2 (n=6), 10 gün süreyle tekrarlayan dozlarda GnRH uygulanan Grup 3 (n=6) olarak rastgele 4 gruba ayrıldı. Uygulama sonunda sakrifiye edilen ratlardan ovaryum ve uteruslar alınarak histolojik doku takip prosedürü ardından bloklandı. Kesilen dokular immunohistokimyasal olarak östrojen, progesteron reseptörlerinin dağılımı ve boyanma şiddeti yönünden incelendi. Kontrol ve 1 grupta ovaryumlar değerlendirildiğinde; Östrojen  $\alpha$  reseptörlerinin, foliküllerdeki granuloza hücrelerinde, primer, sekonder ve graaf folikül duvarında granuloza hücrelerinde (+) olarak görüldü. Germinatif epitelde, damar duvarı endotel hücreleri, düz kas hücrelerinde ve interstisyel hücrelerde (+) reaksiyonlar tespit edildi. Kornu ve korpus uteri bölümlerinden alınan doku örneklerinde ise endometriyum epitelinde (+) reaksiyonlar görüldü. Grup 2 ve 3'te, ovaryum da benzer yerleşim bölgelerinde fakat boyanma şiddeti yönünden farklı şiddette reaksiyonlar tespit edildi. Progesteron B reseptörlerinin; Grup 1,2,3 ve 4'te korpus luteum luteal hücreleri, germinatif epitel, teka interna / eksterna hücreleri pozitif reaksiyon gösterdiği, gruplar arasında boyanma şiddetinin değiştiği görüldü. Kornu ve korpus uteride endometriyum epiteli, stratum bazalis bölgesi, miyometriyum ve perimetriyumda (+) reaksiyonlar tespit edilirken kontrol grubu örneklerinde miyometriyum bölgesinde (+) reaksiyon tespit edilemedi.

**Anahtar Kelimeler:** İmmunohistokimya, Östrojen reseptör  $\alpha$ , Ovaryum, Progesteron reseptör B, Uterus



## GİRİŞ

Gonadotropin-salglıatıcı hormon (GnRH) gonadotropinler diye bilinen, folikül stimulan hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH)'ın ve sonrasında gonadal hormonların sentezini ve sekresyonunu kontrol eden dekapeptid yapıli bir hormondur (King ve Millar 1995). En iyi bilinen ovaryum salgıları steroid hormonlardır ve bu salgılar ovaryumdaki korpus luteumdan, çeşitli aşamalıdaki foliküllerden, interstisyel hücrelerden salgılanırlar (Schams ve Berisha 2002). Ovaryumdan salgılanan steroid hormonların başlıcaları östrojen ve progesterondur. Bu hormonlar dişilerde üreme organlarının morfolojik ve fonksiyonel değışimlerinin kontrolünde rol oynarlar (Srisuwatanasagul ve ark. 2009).

Östrojen, steroidogenezi ve folikülogenezi iyi bilinen bir düzenleyicidir. Östrojen ovaryum granuloza hücre proliferasyonunu uyararak foliküler gelişimi düzenlemektedir. Granuloza hücrelerinden FSH salgısının artması ve granuloza hücreleri arasındaki etkileşim bilinmektedir (Drummond ve Findlay 1999; Merk ve ark. 1972). Ovaryum içi östrojenle ilgili hareketlerde ovaryum dokusu içerisinde dağılık olarak bulunan Östrojen reseptörü alfa (ER $\alpha$ ) ve östrojen reseptörü beta (ER  $\beta$ ) adlı iki spesifik östrojen reseptörü bulunmaktadır (Hulas-Stasiak ve Gawron 2007). Yapılan immuno-histokimyasal çalışmalar birçok hayvan türünde bu iki östrojen reseptörünün yerleşimini ve dağılımını ortaya koymuştur (Hild -Petito ve ark., 1988; Chiang ve ark. 2000; Rosenfeld ve ark. 1999; Slomczynska ve Wozniak 2001).

Progesteron hormonu memelilerde reprodüktif faaliyetleri düzenleyen, korpus luteum tarafından sentezlenen bir hormondur (Dellman ve Eurell 1988). Progesteron hedef dokularda spesifik hücre içi progesteron reseptörlerine (PR) bağlandıktan sonra etkili olur. Progesteron reseptörlerinin iki izoformu bulunmaktadır, bunlar Progesteron reseptör A (PR-A), Progesteron reseptör B (PR-B) dir (Graham ve Clarke 1997). Progesteron reseptör C (PR-C) adı verilen fakat göğüs kanseri gibi patolojik durumlarda belirlenen progesteron reseptörü de vardır (Wei ve Miner 1994). Progesteron reseptörleri, östrüs siklusunun farklı aşamalarında ovaryumda sığırlar, köpekler gibi farklı hayvanlarda çalışılmıştır (Van den Broeck ve ark. 2002; Vermeirsch ve ark. 2001).

## MATERYAL ve METOT

### Hayvanların Gruplandırılması ve Dokuların Alınması

Çalışmanın planlanması sürecinde, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 07.01.2016 tarihinde 65202830-050.04.04.06 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Çalışmanın için kullanılan hayvanlar, 250-300 gr ağırlığındaki (n=24) Wistar Albino dişiler ratlar, Kontrol grubu (n=6) 0,3 ml placebo (fizyolojik tuzlu su) njeksiyonu yapılmıştır. Grup1 (n=6) tek doz (0,3 ml) GnRH (Lesirelin asetat, 25 $\mu$ g/ml), Grup 2 (n=6), 5 doz (0,3x5=1,5 ml) GnRH (Lesirelin asetat, 25 $\mu$ g/ml), Grup 3 (n=6) 10 doz (0,3 x 10=3,0 ml) GnRH (Lesirelin asetat, 25 $\mu$ g/ml) enjeksiyonu yapılan ratlar olarak rastgele gruplandırıldı. Her gruptaki hayvanlar son enjeksiyon yapılan günden 1 gün sonra sakrifiye edilerek ovaryum ve uterusları alındı.

Elde edilen ovaryumlar ve uteruslar, morfolojik görünümleri değerlendirilip % 10'luk tamponlu nötr formaldehit içerisinde 24 saat süreyle tespit edilip, rutin histolojik metotlarla işlenerek paraplast ile bloklandı (Bancroft ve Cook 1984). Her bir dokudan elde edilen 4  $\mu$ m

kalınlığındaki seri kesitler, PR- B reseptörü ve ER  $\alpha$  belirleyebilmek amacıyla immuno-histokimyasal olarak boyandı.

### İmmunohistokimyasal Prosedür

İmmuno-histokimyasal olarak dokular ABC metoduyla, Abcam tarafından belirlenen protokole göre boyandı. Doku kesitleri (4 $\mu$ m) polysine ile kaplı lamlara alındı (Thermo scientific, Menzel -Glaser, Germany). Deparafinize edilen kesitlere rehidrasyon sonrası, antijen retrieval (citrate buffer%10 pH: 6) 40dk kaynatılarak uygulandı. Oda ısısında soğutulduktan sonra (%3 metanolde) H2O2de 20 dk nonspesifik boyanmaları önlemek için peroksidaz blokajı yapıldı. PBS yıkamasından sonra 1/5 konsantrasyonda rabbit serum 10 dk inkübe edilerek protein blokaj yapıldı. 1/100 konsantrasyonda östrojen  $\alpha$  (Santa Cruz Bioteknoloji- 53493), 1/50 konsantrasyonda PR B (Santa Cruz Bioteknoloji-2615) primer antikorları ile oda ısısında 2 saat inkübe edildi. PBS ile yıkama yapıldı. 20 dk biotin uygulandı, 20 dk PBS yıkamasından sonra 20 dk streptavidin peroksidaz uygulandı. PBS sonrası 10 dk AEC (zymed, 3- Amino-9-ethylcarbazole) takiben Mayer's hematoksileni ile zemin boyaması yapıldı, su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı.

### Semikantitatif Analiz ve Skorlama

Ovaryum, kornu uteri ve korpus uteri bölümleri ER  $\alpha$  ve progesteron B reseptörlerinin İmmunohistokimyasal olarak (+) reaksiyon vermelerine göre farklı iki araştırmacı (Uslu S. ve Yörük M.) tarafından değerlendirildi ve ortalama değerler bulgular bölümüne eklendi. İmmunohistokimyasal olarak AEC kromojen ile kırmızı boyananlar (+) reaksiyon verenler olarak, kırmızı boyanma görülmeyenler ise (-) reaksiyon verenler olarak adlandırıldı. Araştırmadaki sonuçlar boyanma yoğunluğu ve boyanma şiddeti olarak iki şekilde semi-kantitatif biçimde oluşturuldu. Boyanma yoğunluğu skoru, stoplazma, çekirdek ve membranda bulunan pozitif alanları yansıtmaktadır. % 0: boyanma yok, 0. (-) %00 - %20 : zayıf yoğunluk, 1. (+) % 20 -50: orta yoğunluk, 2. (++) % 50- 80 : yoğun 3. (+++) Boyanma şiddeti; boyanma yok : 0, (-) zayıf reaksiyon: 1, (+) Orta reaksiyon: 2, (++) güçlü reaksiyon: 3 (+++) şeklinde değerlendirildi (Brown ve Lamartiniere 2000).

## BULGULAR

### ER $\alpha$ Bulguları

Kontrol, Grup 1, 2, 3'e ait ovaryum örnekleri değerlendirildiğinde foliküllerdeki granuloza hücrelerinde primer, sekonder ve graf folikül duvarında granuloza hücrelerinde (+) reaksiyon olduğu görüldü. Germinatif epitelde ER $\alpha$  reseptörleri (+) olarak belirlendi. Damar duvarı endotel hücreleri, düzkas hücrelerinde ve İnterstisyel hücrelerde (+) reaksiyonlar tespit edildi (Tablo 1).

Kornu ve korpus uteri bölümlerinden alınan doku örneklerinde endometriyum epiteli, stratum bazalis yakınlarındaki stromal bölge, miyometriyum ve perimetriyum bölgesindeki (+) reaksiyonlar değerlendirildiğinde; Grup 1, 2, 3 te endometriyum epiteli, stratum bazalis, ve miyometriyumda (+) reaksiyonlar belirlendi.

### PR B Bulguları

Ovaryum doku örnekleri PR B reseptörlerinin korpus luteum luteal hücreleri, korpus albicans hücreleri, germinatif epitel, teka interna/eksterna hücreleri ve stromal hücrelerde incelenerek kontrol grubu, Grup 1, 2, 3

te pozitif reaksiyon ve boyanma şiddetinin değiştiği görüldü (Tablo 1).

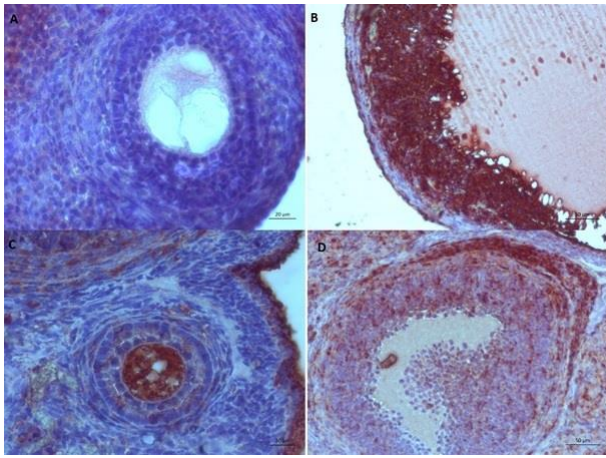
Kornu ve korpus uteri kontrol grubu, Grup 1, 2, 3'te endometriyum epitel, stratum bazalis bölgesi,

miyometriyum ve perimetriyumda (+) reaksiyonlar tespit edilirken kontrol grubu örneklerinde miyometriyum bölgesinde (+) PR B reaksiyonu tespit edilemedi.

**Tablo 1.** GnRH enjeksiyonu sonrası ovaryum, korpus ve kornu uterilerinde ER $\alpha$  ve PR B'nin immunohistokimyasal lokalizasyonlarının boyanma şiddeti ve yoğunluk ortalaması skoru.

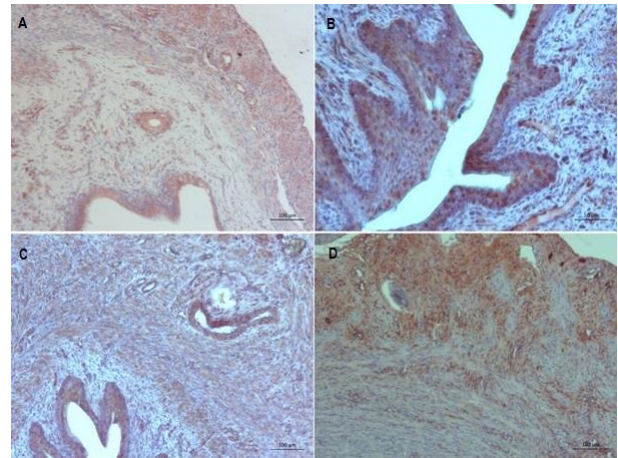
**Table 1.** The staining intensity and intensity mean score of the immunohistochemical localizations of ER $\alpha$  and PR B in the ovary, corpus and cornu uteri after GnRH injection.

Ovaryum	ER $\alpha$				PR-B			
	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Germinatif epitel	+	+	+	+++	++	++	++	++
Granuloza hücreleri	++	++	+++	++	-	-	-	-
Teka eks/teka int	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Korpus luteum/Korpus albicans					-/+	-/+	-/+	-/+
Kornu ve Korpus uteri								
Yüzey epitel	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Str bazalis ve bağ doku	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+
Miyometriyum ve perimetriyum	++/++	++/++	++/++	++/++	-/-	++/++	++/++	++/++



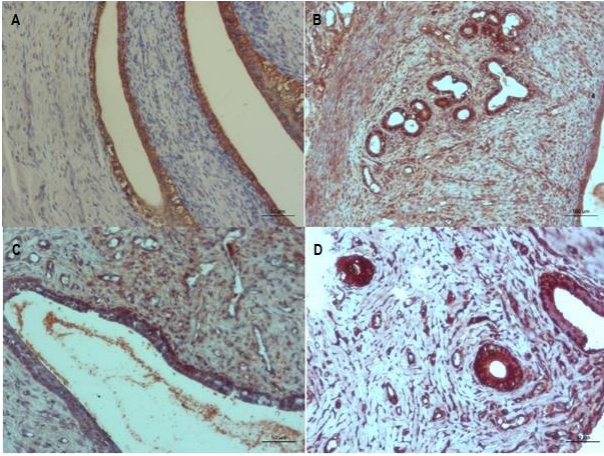
**Şekil 1.** Ovaryum östrojen  $\alpha$  boyamalarının Grup 1, 2, 3 de gösterimi. **A-** Grup 1, ovaryum, primer folikül, östrojen  $\alpha$  (+); **B-** Grup 2, ovaryum, granuloza hücreleri, östrojen  $\alpha$  (+); **C-** Grup 3, ovaryum, primer folikül ve germinatif epitel, östrojen  $\alpha$  (+); **D-** Grup 3, ovaryum, tersiyer follikül, teka interna ve externa, östrojen  $\alpha$  (+).

**Figure 1.** Display of ovarian estrogen  $\alpha$  staining in Groups 1, 2, 3. **A-** Group 1, ovary, primary follicle, estrogen  $\alpha$  (+); **B-** Group 2, ovary, granulosa cells, estrogen  $\alpha$  (+); **C-** Group 3, ovary, primary follicle and germinative epithelium, estrogen  $\alpha$  (+); **D-** Group 3, ovary, tertiary follicle, theca interna and externa, estrogen  $\alpha$  (+).



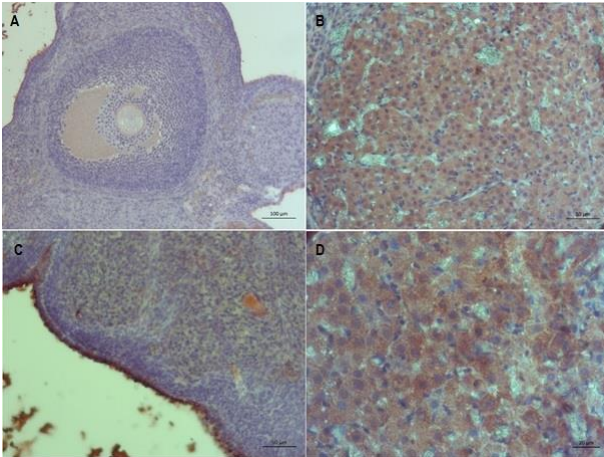
**Şekil 2.** Korpus uteri östrojen  $\alpha$  boyamalarının Grup 1, 2, 3 de gösterimi. **A-** Grup 1, korpus uteri, östrojen  $\alpha$  (+); **B-** Grup 2, korpus uteri, endometriyum, östrojen  $\alpha$  (+); **C-** Grup 1, korpus uteri, endometriyum, epitel ve bezde östrojen  $\alpha$  (+); **D-** Grup 3, korpus uteri, myometriyum, östrojen  $\alpha$  (+).

**Figure 2.** Representation of corpus uteri estrogen  $\alpha$  staining in Groups 1, 2, 3. **A-** Group 1, corpus uteri, estrogen  $\alpha$  (+); **B-** Group 2, corpus uteri, endometrium, estrogen  $\alpha$  (+); **C-** Group 1, corpus uteri, endometrium, epithelium and gland estrogen  $\alpha$  (+); **D-** Group 3, corpus uteri, myometrium, estrogen  $\alpha$  (+).



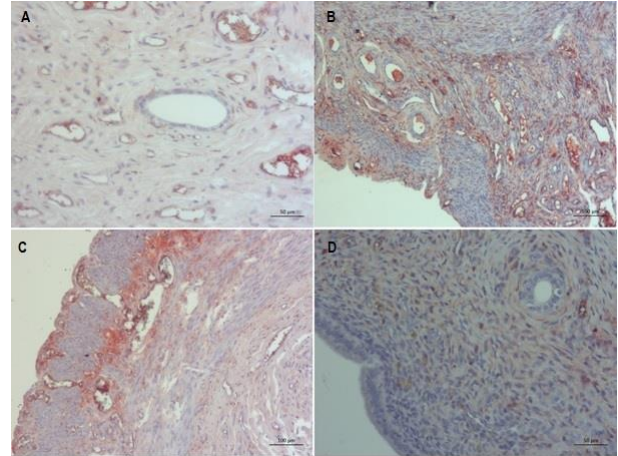
**Şekil 3.** Kornu uteri östrojen  $\alpha$  boyamalarının Grup 1, 2, 3 de gösterimi. **A-** Kontrol kornu uteri, Östrojen $\alpha$ (+); **B-** Grup 1, kornu uteri, endometrium bez epiteli, östrojen  $\alpha$ (+); **C-** Grup 2, kornu uteri, endometrium, östrojen  $\alpha$  (+); **D-** Grup 2, kornu uteri, endometrium bezleri, östrojen  $\alpha$  (+).

**Figure 3.** Display of Kornu uteri estrogen  $\alpha$  staining in Groups 1, 2, 3. **A-** Control corn uteri, Estrogen $\alpha$  (+); **B-** Group 1, cornu uteri, endometrial gland epithelium, estrogen  $\alpha$  (+); **C-** Group 2, cornu uteri, endometrium, estrogen  $\alpha$  (+); **D-** Group 2, cornu uteri, endometrial glands, estrogen  $\alpha$  (+).



**Şekil 4.** Ovaryum PR-B boyamalarının Grup 2, 3 de gösterimi. **A-** Grup 2, ovaryum, teka externa, PR-B (+); **B-** Grup 2, ovaryum, luteal hücreler, PR-B (+); **C-** Grup 3, ovaryum, germinatif epitel, PR-B (+); **D-** Grup 3, ovaryum, luteal hücreler, PR-B (+).

**Figure 4.** Display of ovary PR-B staining in Group 2, 3. **A-** Group 2, ovary, theca externa, PR-B (+); **B-** Group 2, ovary, luteal cells, PR-B (+); **C-** Group 3, ovary, germinative epithelium, PR-B (+); **D-** Group 3, ovary, luteal cells, PR-B (+).



**Şekil 5.** Kornu uteri PR-B boyamalarının Kontrol ve Grup 2, 3 de gösterimi. **A-** Kontrol grubu, kornu uteri, PR-B (+); **B-** Kontrol grubu, korpus uteri, PR-B (+); **C-** Grup 2, kornu uteri, PR-B (+); **D-** Grup 3, kornu uteri, PR-B (+).

**Figure 5.** Display of Kornu uteri PR-B staining in Control and Group 2, 3. **A-** Control group, cornu uteri, PR-B (+); **B-** Control group, corpus uteri, PR-B (+); **C-** Group 2, cornu uteri, PR-B (+); **D-** Group 3, cornu uteri, PR-B (+).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Ratlarda östrüs siklusunun değişik dönemlerinde östrojen ve progesteron reseptörlerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmada da farklı doz ve sürelerde eksojen GnRH uygulamasının östrojen ve progesteron reseptörleri üzerine immünohistokimyasal etkileri incelenmiştir.

GnRH düşük dozda uygulanması ile ovulasyon üzerine etkili olarak görülmüştür. Ratlarda yapılan çalışmada uygulanan GnRH ovulasyonun baskılanması üzerinde etkili belirlenmiştir (Reissmann ve ark. 2000). Uzun süreli GnRH uygulamaları ise FSH ve LH konsantrasyonuna etki ederek folikül gelişimine, uterus ağırlığına, ovaryum makroskopi ve mikroskopisine, östrüs siklus bulguları üzerine etkili görülmüştür (Janssens ve ark. 2000).

Yapılan çalışmada ovaryum, uterusda makroskopik ve mikroskopik değişimler olduğu tanımlandı. Ovaryumda folikül gelişimini sayısal ve yapısal olarak arttırdığı belirlendi. Uterus da kornu, korpus bölümlerinde yapısal farklılaşmaların başladığı östrojen ve progesteron reseptörlerinin boyanma şiddeti ve boyanma yoğunlukları üzerine etkili olduğu görüldü. Bu sonuçlar uzun süreli GnRH uygulamasının ovaryum ve uterus üzerine etkili olduğunu ifade eden Soltysik ve ark. (2014)'nin çalışması ile uyum göstermektedir. Soltysik ve ark. (2014), GnRH uygulamasının iki hafta süreden sonra siklus üzerine, folikülogenezis üzerine, ovulasyon üzerine, androjen reseptörlerinin, östrojen reseptörlerinin ve progesteron reseptörlerinin stroma ve çekirdek yerleşimi üzerine etkili olduğu uterusda ise yapısal değişime sebep olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışma ise 10 gün ve 5 gün GnRH uygulamalarının reseptör yerleşiminde boyanma şiddet ve yoğunluk bakımından etkili görülmüştür. Progesteron reseptörlerinin 10 gün ve 5 gün GnRH uygulanan gruplarda ovaryum ve uterusun iki kısmında daha yoğun olması luteinizasyon üzerine GnRH etkisini düşündürmektedir. GnRH uygulamalarının bu iki grupta folikülogenezisin ve östrojen  $\alpha$ 'nın immünohistokimyasal reaksiyon şiddetinin arttığı görülmüştür (Roth ve ark. 2000). GnRH uygulamalarının 10 gün süreden daha az uygulanmasında uterusda ağırlık kaybı şekillenmediği, yapısal olarak

preparatlarda da farklılık görülmediği söylenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Östrojen  $\alpha$  ve Progesteron B reseptörlerinin yoğunluklarının tek doz uygulamada değişmediği 5 gün ve 10 gün uygulamalarında ise benzer olarak değişimin olduğu tespit edilmiştir. Soltysik ve ark. (2014) çalışmalarında ovaryum ve uterusu uzun süreli uygulamalarla değişikliklerin olduğu ve hormonal geri dönüşümün olabildiği belirtilmiştir.

Östrojen  $\alpha$  reseptörünün farelerde uterus duvar kalınlığı uterus hacmi ve infertilite üzerine etkili olduğunu araştırılmış ve etkili olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark. 2009). Farelerde desidua formasyonu ile östrojen progesteron reseptörlerinin bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Winuthayanon ve ark. 2010). Yapılan çalışmada da GnRH uygulamalarından uterus endometriyum bez hücreleri ve epitel hücrelerinin etkilenmiş olması östrojen ve progesteron reseptör yoğunluğunun hormonal değişimden etkilendiği uygulama süre ve dozu arttıkça etkinin değiştiği belirlenmiştir. Östrojen reseptörlerinin ve progesteron reseptörlerinin dağılımının, rolünün ovaryum ve uterusu, benzer olmadığı bildirilmiştir (Winuthayanon ve ark. 2010). Yapılan çalışmada da östrojen  $\alpha$  ve progesteron B nin yerleşim yerlerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada GnRH uygulamalarının östrojen  $\alpha$  ve progesteron B ekspresyonu üzerine etkisi araştırılarak tek doz uygulama da kontrol grubuna benzer olan yoğunluk ve yerleşimde reseptörler belirlenmiştir. Beş ve on gün uygulamalarında ise östrojen  $\alpha$  ekspresyonun ovaryum ve uterusu yer yer boyanma şiddeti olarak arttığı görülmüştür. Progesteron B nin ise ovaryumda üç grupta da benzer yoğunluk ve yerleşimde olduğu uterusu ise on gün GnRH uygulama yapılan grupta ise endometriyum ve miyometriyum bölgelerinde artış gösterdiği görülmüştür.

Teilman ve ark. (2006), PR-B reseptörlerinin sığırlarda sekonder ve tersiyer foliküller, granüloza hücreleri, teka interna ve teka eksterna hücrelerinde lokalize olduğu bildirilmiştir. Progesteron üretiminin sadece granüloza hücreleriyle değil, aynı zamanda teka interna ve teka eksterna tarafından da üretilebildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, progesteronun sığırlarda daha önce bildirildiği üzere PR'nün immünohistokimyasal olarak boyanması üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Haeseleer ve ark. 2006). Ratlarda yapılan çalışmada kontrol grubunda korpus luteum luteal hücrelerinin yoğun ve şiddetli pozitif olarak boyandığı görüldü. Korpus albikanslarda zayıf pozitiflik, germinatif epitelde ise orta şiddette pozitiflik ve yoğun olarak her alanın boyandığı görüldü. Grup 1 ovaryum örneklerinde progesteron B reseptörlerinin korpus luteuma ait luteal hücrelerde orta ve zayıf (+) immünohistokimyasal reaksiyon verdiği belirlendi. Grup 2 ye ait ovaryum örneklerinde irili ufaklı korpus luteum sayısının fazla olduğu görüldü. Luteal hücrelerde yoğun reaksiyon ve boyanma derecesi orta ve güçlü belirlendi. Germinatif epitel ve bazı stromal hücrelerde de (+) boyanmalar görüldü. Teka interna ve eksterna larda progesteron B (+) reaksiyon zayıf olarak tespit edildi. Grup 3 ovaryum kesitlerinde de korpus luteum sayısının fazla olduğu, luteal hücrelerde de yoğun boyanma reaksiyonları belirlendi. Germinatif epitelde progesteron B güçlü (+) olarak tespit edildi.

İneklerde yapılan bir başka çalışmada (Akbalık ve ark. 2011), luteal ve folliküler fazda ovaryumlarda ER ve PR'lerinin lokalizasyonu ve yoğunluğu karşılaştırılmış ve PR-B'nin immünohistokimyasal olarak germinatif epitel, stroma hücreleri, korpus albicans ve CL'da pozitif reaksiyon (+) verildiği, ER- $\alpha$ 'nın granüloza, germinatif epitel ve luteal hücrelerinde primer folikül hücrelerinde

immünohistokimyasal olarak (+) reaksiyon cevap verildiği bildirilmiştir. Lokalizasyonun olarak incelenen rat ovaryumunda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Teilman ve ark. (2006), farelerde yaptıkları bir çalışmada, uygulama yapılmayan grupta PR zayıf boyandığı fakat farelere hCG uygulaması ile yapılan boyamalar sonucu güçlü bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir. Granüloza hücreleri, preovulator folliküllerin boyandığı kumulus hücrelerinin boyanmadığı tespit edilmiştir (Teilman ve ark. 2006). Bu boyanma derecelerinin ve reaksiyon gücünün GnRH ile hCG uyarımı ile boyanma özelliklerinin artırılabilirliğini göstermektedir. Yapılan çalışma Teilman ve ark. (2006)'nın sonuçları ile uyumludur.

Mevcut sonuçlar değerlendirildiğinde; ratlara GnRH'nin tek enjeksiyonu ve tekrarlayan enjeksiyonları ile ovaryum ve uterusu ER $\alpha$  ve PR-B reseptörlerinin (+) reaksiyonlar gösterdiği belirlenmiştir. Tekrarlayan dozlarda GnRH enjeksiyonunun ER $\alpha$  ve PR-B reseptörlerinin dağılımlarına, yoğunluğuna kısmen etkili olduğu, boyanma reaksiyonuna şiddetine ise etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan bu çalışmadaki GnRH hormon uygulamalarının, ileride yapılacak olan üreme hormonu uygulamalarının, immünohistokimyasal etkilerinin araştırıldığı çalışmalara kaynak teşkil edeceği ve bu konudaki literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## TEŞEKKÜR

Çalışmamızı, VF-049 nolu proje ile destekleyen, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Akbalık ME, Sağsöz H, Saruhan BG (2011).** Localization of estrogen receptor alpha and progesterone receptor B in the bovine ovary during the follicular and luteal phase of the sexual cycle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 795-802
- Bancroft JD, Cook HC (1984).** Manuel of Histological Techniques. Churchill Livingstone Inc. New York.
- Brown NM, Lamartiniere CA (2000).** Genistein regulation of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor (EGF) and EGF Receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ*, 11, 255-260.
- Chiang CH, Cheng KW, Igarashi S ve ark. (2000).** Hormonal regulation of estrogen receptor alpha and beta gene expression in human granulosa-luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 3828-3839.
- Chen M, Wolfe A, Wang X ve ark. (2009).** Generation and characterization of a complete null estrogen receptor alpha mouse using Cre/LoxP technology. *Mol Cell Biochem*, 1-2, 145-153.
- Delman HD, Eurell JA (1988).** Textbook of Veterinary Histology, 5th ed Williams-Wilkins London pp: 252-325.
- Drummond AE, Findlay JK (1999).** The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 151, 57-64.
- Graham JD, Clarke CL (1997).** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18, 502-519.
- Haeseleer MD, Simoens P, Van den Broeck W (2006).** Cell-specific localization of progesterone receptors in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 98, 271-281.
- Hild-Petito S, Stouffer RL, Brenner RM (1988).** Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology*, 123, 2896-2905.
- Hulas-Stasiak M, Gawron A (2007).** Immunohistochemical localization of estrogen receptors ER alpha and ER beta in the spiny mouse (*Acomys Cahirinus*) ovary during postnatal development. *J Mol Hist*, 38, 25-32.
- Janssens RM, Brus L, Cahill DJ ve ark. (2000).** Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum Reprod Update*, 6, 505-518.

- King JA, Millar RP (1995).** Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol*, 15, 5-23.
- Merk FB, Botticelli CHR, Albright JT (1972).** An intercellular response to estrogen by granulosa cells in rat ovary; an electron microscope study. *Endocrinology*, 90, 992-1007.
- Reissmann T, Schally AV, Bouchard P ve ark. (2000).** The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod Update*, 6, 322-331.
- Rosenfeld CS, Yuan X, Manikkam M ve ark. (1999).** Cloning, sequencing and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 60, 691-697.
- Roth Ch, Leonhardt S, Seidel CH ve ark. (2000).** Comparative analysis of different puberty inhibiting mechanisms of two GnRH agonists and the GnRH antagonist cetrorelix using a female model. *Pediatr Res*, 48, 468-474.
- Schams D, Berisha B (2002).** Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domestic Anim Endocrinol*, 23, 53-65.
- Slomczynska M, Wozniak J (2001).** Differential distribution of estrogen receptor beta and estrogen receptor alpha in the porcine ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109, 238-244.
- Soltysik K, Czekał P, Suszka-Switek A ve ark. (2014).** Changes in the subcellular and tissue location of estrogen and progesterone receptors in rat uterus after long-term treatment with analogs of gonadoliberin. *Ginekol Po*, 185, 254-263.
- Srisuwatanasagul S, Tummaruk P, Kunavongkrit A (2009).** Studies of oestrogen and progesterone receptors in reproductive organs of prepubertal gilts with reproductive disturbance. *Thai J Vet Med*, 40, 15-24.
- Teilmann SC, Clement CA, Thorup J ve ark. (2006).** Expression and localization of the progesterone receptor in Mouse and human reproductive organs. *J Endocrinol*, 191, 525-535.
- Van den Broeck W, D'Haeseleer M ve ark. (2002).** Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. *Reprod Domest Anim*, 37, 164-170.
- Vermeirsch H, Simoens P, Ccorijn M ve ark. (2001).** Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction*, 122, 73-83.
- Wei LL, Miner R (1994).** Evidence for the resistance of a third progesterone receptor protein in human breast cancer line T47D. *Cancer Research*, 54, 340-343.
- Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD ve ark. (2010).** Uterine epithelial estrogen receptor is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci*, 45, 19272-19277.



## Thermographic and Histopathological Evaluation of Injectable Platelet Rich Fibrin On Treatment Of Second Degree Burn Wounds: Rabbit Model

Tunahan SANCAK\*<sup>ID</sup> İsmail ALKAN<sup>ID</sup>

*Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Van, Turkey*

Received: 26.10.2020

Accepted: 04.11.2020

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to evaluate the contribution of injectable platelet rich fibrin (i-PRF) to the healing of burn wounds using histopathological and thermographic data. For this purpose, 36 New Zealand rabbits were divided into two groups as the study and the control. After the burns were formed in rabbits in the study group, i-PRF was administered on 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days. In the control group, 0.9% isotonic solution was administered on the same day. After burning, the temperature of burn area was measured with infrared thermal camera on 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days. Randomly 6 rabbits were selected from both the study group and the control group. These rabbits were sacrificed on days 7, 14 and 21 and specimens were taken for histopathological examination from the burn area. In the examinations, it was observed that i-PRF increased cellular activity and accordingly, statistically significant temperature differences occurred between the burned area and normal skin on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days in the study group compared to the control group (p < 0,05). The results of this research showed that i-PRF accelerates epithelization and collagenization in burn wounds. It is thought that many studies are needed in order to better understand the effect of i-PRF on wound healing.

**Keywords:** Burn, i-PRF, Thermography, Treatment, Wound

### ÖZ

## İkinci Derece Yanık Yaralarının Sağaltımında Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin Kullanımının Termografik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi: Tavşan Modeli

Bu çalışmada, enjekte edilebilir trombositten zengin fibrinin (E-TZF) yanık yaralarının iyileşmesine katkısının histopatolojik ve termografik veriler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ikinci derece yanık yarası oluşturulan 36 adet Yeni Zellanda tavşanı çalışma ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışma grubundaki tavşanlara yanık oluşturulduktan sonra E-TZF 1., 3. ve 7. gün uygulanırken, kontrol grubundaki tavşanlara %0,9'luk izotonik solüsyonu aynı günlerde uygulanmıştır. Yanık oluşturulduktan sonra yanık bölgesinin sıcaklığı 1., 2., 3., 7., 14. ve 21. günlerde infrared termal kamerayla ölçülmüştür. Çalışma ve kontrol grubundan rastgele seçilen 6'şar tavşan 7., 14. ve 21. günlerde sakrifiye edilerek yanık bölgesinden histopatolojik inceleme için örnekler alınmıştır. Yapılan incelemelerde E-TZF'nin hücresel aktiviteyi artırdığı ve buna bağlı olarak çalışma grubunda yanık bölgesiyle normal deri arasında 7., 14. ve 21. günlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sıcaklık farklılıkları oluştuğu gözlemlenmiştir (p<0,05). Bu araştırmanın sonuçları E-TZF'nin yanık yaralarında epitelizeasyonu ve kollejenizasyonu hızlandırdığını göstermektedir. E-TZF'nin yara iyileşmesi üzerine etkisini daha iyi anlayabilmek için çok sayıda araştırmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** E-TZF, Sağaltım, Termografi, Yanık, Yara

### GİRİŞ

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır (Özkorkmaz ve Özay 2009). Yaralardaki iyileşme, sadece yara bölgesiyle sınırlı kalmaz. Bu süreç bütün sistemleri içeren hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar

bütünüdür (Gurtner ve Wong 2007; Parsak ve ark. 2007).

Isı, kimyasal maddeler, elektrik ve radyoaktif ışınlar ile oluşan doku hasarına yanık denir (Aksoy 2015). Yanık; hasarın deri-derialtı dokularda oluştuğu, fakat derinliği ve yüzey alanı, yanığı oluşturan sebeplere bağlı olarak tüm vücudu etkileyen fizyopatolojik süreçtir (Özkaya ve ark. 2014). Yanık derinliğini tayin etmek için birçok yardımcı

\*Corresponding author: tunahansancak@hotmail.com

\*This research article was summarized from the first author's PhD thesis.





yöntem ve teknikten yararlanılabilir. Bunun için kullanılan teknik ve metodlar; klinik gözlem (ağrı, renk, bül), iyileşme süreci, biyopsi, floresan florometresi, vital boyalar (Metilen mavisi), lazer doppler flowmetri, termografi, nükleer magnetik rezonans görüntüleme ve kızılötesi ışın şeklinde sıralanabilir (Çetinkale 1997).

Yara iyileşmesini hızlandırmak için yapılan araştırmalar, uygun şartlarda hazırlanan, normal miktarının 4-5 katı daha fazla trombosit konsantrasyonlu ve kırmızı kan hücreli bir ürün elde etmek gerektiğini göstermektedir. Bir canlıda normalde trombosit sayısı mililitrede 250.000 iken, trombosit zengin plazmada bu sayısı mililitrede 1.000.000'dur. Bu miktar terapötik düzeydir (Jameson 2007). Trombositler çok sayıda büyüme faktörü içeren ürünlerdir (Weibrich ve ark. 2001). Son yıllarda, ilk kez Choukran tarafından tanımlanan trombosit zengin fibrin (PRF) sıklıkla kullanılmakta ve araştırılmaktadır. PRF'nin bildirilen avantajları arasında daha hızlı anjiyogenez, daha hızlı yara iyileşmesi, yüksek biyoyumluluk ve düşük maliyet bulunmaktadır. Bu biyolojik özelliklere ek olarak, i-PRF'nin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antibiyofilm özelliklerine ilişkin umut verici çalışmalar son zamanlarda literatürde dikkat çekmiştir (Aydınuyurt ve ark. 2020).

Termografi, hastanın deri yüzeyindeki ısı örneklerini araştıran, kaydeden ve termogram adı verilen görüntüyü oluşturan tanısal bir görüntüleme yöntemidir (Düzgün ve Or 2009). İnfrared termografi, cilt yüzeyinden doğal olarak yayılan kızılötesi radyasyonu kullanarak hastalıkların araştırılmasına olanak sağlar (Ring ve Ammer 2012). İnfrared termal görüntüleme ile veteriner hekimlikte; laminitis'lerin ve sırt ağrılarının teşhisi, tümörlerin erken tanısı, yumuşak doku hastalıkları ve damar lezyonlarının belirlenmesinin yanı sıra topallıkların, Horner sendromunun, stres kırıklarının ve omurga yaralanmalarının tanısında, osteoartritlerin teşhisinde sinir hasarlarında taniya yardımcı olması için kullanılmaktadır (Alan 2012).

Bu çalışmada; tavşanlarda oluşturulan 2. derece yanıklarda, lezyonlu alana enjekte edilebilen trombosit zengin fibrin (E-TZF) uygulamasıyla şekillenen yara iyileşmesinin histopatolojik ve termografik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvan Materyali

Araştırmanın materyal ve metodu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2017/05). Çalışmada ortalama 2-2,5 kg ağırlığında erkek 36 adet Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı. Çalışmanın yürütüldüğü tüm hayvanlara 1 haftalık adaptasyon dönemi sağlandı. Yanık oluşturma ve histopatolojik inceleme için örnek alma aşamalarından önce tavşanlar 5 mg/kg Xylazine hidroklorür (Rompun, Bayer HealthCare LLC, Germany) ve 50 mg/kg Ketamine hidroklorür'le (*Alfamine*, Egevet, İzmir, Türkiye) genel anesteziye alındı.

### Yanık Oluşturma

Denemelerden önce bölgenin traş ve dezenfeksiyonu yapıldı. Denekler genel anesteziye alındı. Bütün hayvanların lumbosakral bölgesinde dorsomedian hatta yaklaşık 2x5 cm alanında genel anestezi altında 2. derece yanık yarası oluşturuldu. Yanıklar, 100°C'de kaynayan suda 5 dakika boyunca bekletilen pirinç bar (yaklaşık 211 gr ağırlığında, 2x5 cm taban yüzeyine sahip) ile yanık oluşturulacak bölgeye 15 sn boyunca pirinç barların

ağırlığı dışında herhangi bir baskı yapılmadan oluşturuldu (Arslan ve ark. 2012). Yanık oluşturulduktan sonra bütün hayvanlara intraperitoneal olarak hayvanın cüssesine göre 3-4 ml/kg olarak (8-10 cc) laktatlı ringer solüsyonu verildi.

### Enjekte Edilebilen Trombosit Zengin Fibrinin Hazırlanması

Her deney hayvanından 9 ml kan alındı ve E-TZF tüplerine aktarıldı. Kanlar santrifüj cihazına yerleştirildi ve 2 dakika süreyle 3300 rpm'de işleme tabi tutuldu (Mourão ve ark. 2015). Santrifüj gerçekleştirildikten sonra E-TZF çalışma grubundaki tavşanlara yanık yarasına hem subkutan olarak hem de gazlı beze emdirilerek lezyon oluşturulan alana uygulandı.

### Hayvan Deneyleri

Tavşanlar randomizer programına (Research Randomizer) göre çalışma ve kontrol olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

**1.Grup (Çalışma grubu):** Yanık yarası oluşturulan tavşanlardan rastgele 18 tanesine E-TZF uygulandı. E-TZF'nin yaklaşık 1,5 cc'si lezyonlu alanın kenarlarından subkutan olarak postoperatif 1. gün, 3. gün ve 7. gün uygulandı. Geri kalan yaklaşık 1,5 cc ise gazlı beze emdirilerek enjeksiyonun ardından yara üzerine uygulandı ve steril yara örtüsüyle koruma altına alındı.

**2.Grup (Kontrol grubu):** Kontrol grubunu geri kalan 18 tavşan kontrol grubunu oluşturdu. Bu gruptaki tavşanlara yanık oluşturulduktan sonra subkutan %0,9'luk serum fizyolojik ortalama 1,5 cc olarak postoperatif 1., 3., ve 7. günlerde uygulandı. Çalışma grubundakine benzer olarak gazlı beze 1,5 cc %0,9'luk serum fizyolojik emdirildi ve yara üzerine uygulandı ve steril yara örtüsüyle koruma altına alındı.

### Termografik İnceleme

Yanık oluşturulduktan sonra 1., 2., 3., 7., 14. ve 21. günlerde çalışma ve kontrol gruplarındaki tavşanların yara bölgeleri, herhangi bir işlem yapılmadan önce Flir E50 (FLIR® Systems) marka infrared termal kamerayla (ortam ısı klima ile 21°C±2'ye sabitlenip hava akımının tek yönlü olması sağlanarak) incelendi. Sıcaklık verileri kaydedildi. Alınan verilerden Flir Tools (FLIR® Systems) programıyla hem yanık oluşturulan bölgeden hem de simetriğindeki yanık oluşturulmayan bölgeden alınan sıcaklık verileri incelendi.

### Histopatolojik İnceleme

Çalışma ve kontrol gruplarından 7. günde, 14. günde ve 21. günlerde rastgele seçilen 6'şar tavşan sakrifiye edildi ve gerekli doku örnekleri alındı. Örnekler, yara bölgesinden ve lezyonsuz çevre dokudan yaklaşık 0,5 cm kadar kalınlığı içerecek şekilde alındı ve patoloji laboratuvarına gönderildi. Laboratuvardaki rutin işlemlerden sonra bloklardan 4µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilin-Eozin (H&E) boyama tekniğine göre boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon 80i-DSR12) incelendi.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistik verileri (lezyonlu bölge - simetriği sağlam deri bölgesi) Medyan, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değerler kapsamında değerlendirildi. Kategorik değişkenler için "Sayı" ve "Yüzde" ifadeleri kullanıldı. Yanık bölgesi - simetriği sağlam yanmamış deri bölgesinin sıcaklık ortalamaları karşılaştırmalı olarak Wilcoxon testine tabi tutuldu. Çalışma ve kontrol grupları; yanık yarası kriter alınarak, zamanlar arası farklılıkları göstermede Friedman testiyle incelendi. Diğer taraftan çalışma ve kontrol gruplarındaki yaraların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi ( $\alpha$ )

%5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, ver.24) istatistik paket programları kullanıldı.

## BULGULAR

Bu tez çalışmasında 36 adet Yeni Zellanda tavşanı üzerinde 2. derece yanık yarası oluşturularak yara iyileşmesinde E-TZF uygulamasının etkisi termografik ve histopatolojik veriler kullanılarak değerlendirildi. Yapılan çalışmada çalışma grubunda iyileşme kontrol grubuna göre daha hızlı (%35) şekillendiği ve 21. günde yanık yarası bölgesi makroskopik olarak incelendiğinde çalışma grubunda yara bölgesi kıllarla kapatılıp yara izi kalmazken, kontrol grubunda yara izinin kaldığı ve kıllarla kapatılmadığı belirlendi.

### Termografik Bulgular

Yanık yarası ile normal deri sıcaklığının farkının değerlendirilmesinde "Sıcaklık farkı (°C) = yanık yarası -

normal deri sıcaklığı" formülü uygulandı. Hem çalışma ve hem kontrol grubunda, 1., 2., 3., 7., 14., ve 21. günlerde yanık deri ve normal deri sıcaklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ; Tablo 1). Her iki grupta da tavşanların yanık bölgesindeki sıcaklığının tüm günler arası değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlendi ( $p < 0.05$ , Tablo 2).

Kontrol grubundaki tavşanlar ile çalışma grubundaki tavşanlarda oluşturulan yanık bölgesinin termal kamera ölçümlerinin birbirlerine göre karşılaştırılmasında ise 1. ve 2. günlerde anlamlı bir fark oluşmazken ( $p > 0.05$ , Tablo 3), diğer günlerdeki (3., 7., 14. ve 21. günler) ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tablo 3).

**Table 1.** Kontrol ve çalışma grubunda yanık yarası ile normal deri sıcaklık ölçümlerinin karşılaştırma sonuçları (Wilcoxon testi).

**Table 1.** Comparison results of burn wound and normal skin temperature measurements in control and study groups (Wilcoxon test).

	Kontrol Grubu							Çalışma Grubu						
	N	Medyan	Ort.	Std. S.	Min	Max.	*p.	N	Medyan	Ort.	Std. S.	Min	Max.	*p.
1. gün Yanık Bölgesi	18	36.40	36.59	.65739	35.73	37.99	.000	18	35.81	36.00	.63924	35.01	37.22	.000
1. gün Normal Deri	18	37.07	37.30	.64649	36.52	38.76		18	36.67	36.76	.59175	35.99	37.96	
2. gün Yanık Bölgesi	18	35.81	35.97	.64833	35.11	37.18	.000	18	35.17	35.43	.66068	34.49	36.86	.000
2. gün Normal Deri	18	37.03	37.21	.61316	36.43	38.42		18	36.58	36.66	.58976	35.86	37.75	
3. gün Yanık Bölgesi	18	36.22	36.39	.59030	35.51	37.62	.000	18	36.05	36.19	.63308	35.08	37.17	.000
3. gün Normal Deri	18	37.21	37.33	.55858	36.51	38.51		18	36.85	36.84	.63416	36.09	37.77	
7. gün Yanık Bölgesi	18	36.78	36.90	.58460	36.03	37.97	.003	18	36.44	36.65	.57325	35.86	37.66	.000
7. gün Normal Deri	18	37.25	37.46	.59764	36.66	38.66		18	36.62	36.77	.54369	36.12	37.86	
14. gün Yanık Bölgesi	12	36.91	37.09	.60297	36.13	38.16	.480	12	36.85	36.95	.46952	36.36	37.88	.000
14. gün Normal Deri	12	37.08	36.95	.66096	35.86	38.01		12	36.07	36.26	.61676	35.43	37.66	
21. gün Yanık Bölgesi	6	37.23	37.52	.58975	37.03	38.37	.040	6	37.13	37.19	.42974	36.77	37.91	.018
21. gün Normal Deri	6	36.48	36.41	1.00722	35.13	37.84		6	34.73	34.76	1.63313	32.48	36.76	

\* $p < 0.05$ : istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

**Tablo 2.** Kontrol ve çalışma grubunun günler arası sıcaklık ölçümü karşılaştırma sonuçları (Friedman Testi).**Table 2.** Comparison results of the control and study group between days temperature measurement (Friedman Test).

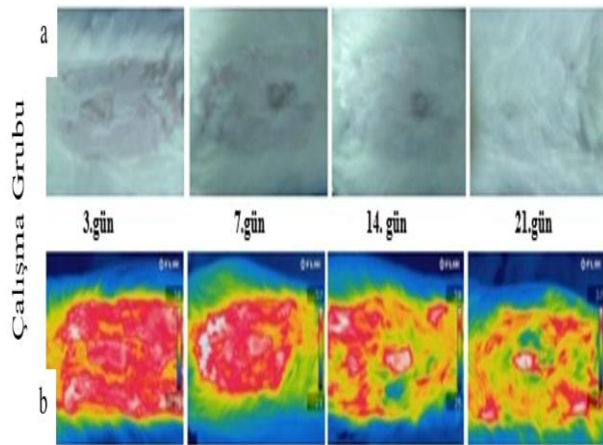
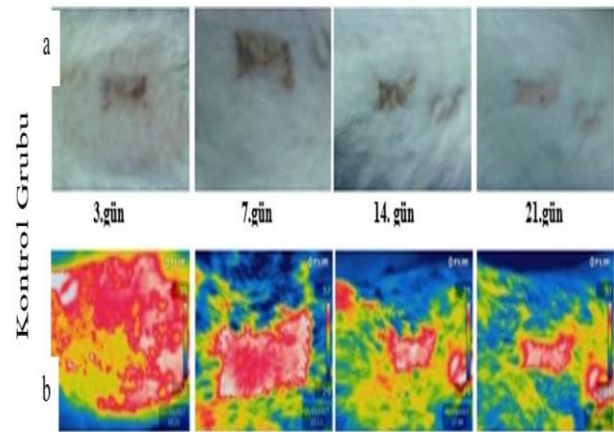
	Kontrol Grubu						Çalışma Grubu					
	N	Ortalama	Std S	Minimum	Maksimum	*p.	N	Ortalama	Std S	Minimum	Maksimum	*p.
1. gün	18	36.59	.65739	35.73	37.99	.014	18	36.00	.63924	35.01	37.22	.000
2. gün	18	35.97	.64833	35.11	37.18		18	35.43	.66068	34.49	36.86	
3. gün	18	36.39	.59030	35.51	37.62		18	36.19	.63308	35.08	37.17	
7. gün	18	36.90	.58460	36.03	37.97		18	36.65	.57325	35.86	37.66	
14. gün	12	37.09	.60297	36.13	38.16		12	36.95	.46952	36.36	37.88	
21. gün	6	37.52	.58975	37.03	38.37		6	37.19	.42974	36.77	37.91	

\*p<0.05: istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

**Tablo 3.** Yanık bölgesi sıcaklık ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırma sonuçları (Mann-Whitney U Testi).**Table 3.** Comparison results of burn zone temperature measurements by groups (Mann-Whitney U Test).

Gün	Kontrol Grubu						Çalışma Grubu						*p.
	N	Medyan	Std. S.	Ort.	Min.	Maks.	N	Medyan	Std. S.	Ort.	Min.	Maks.	
1.	18	36.40	.657	36.59	35.73	37.99	18	35.81	.639	36.00	35.01	37.22	.058
2.	18	35.81	.648	35.97	35.11	37.18	18	35.17	.660	35.43	34.49	36.86	.060
3.	18	36.22	.590	36.39	35.51	37.62	18	36.05	.633	36.19	35.08	37.17	.049
7.	18	36.78	.584	36.90	36.03	37.97	18	36.44	.573	36.65	35.86	37.66	.042
14.	12	36.91	.602	37.09	36.13	38.16	12	36.85	.469	36.95	36.36	37.88	.041
21.	6	37.23	.589	37.52	37.03	38.37	6	37.13	.429	37.19	36.77	37.91	.034

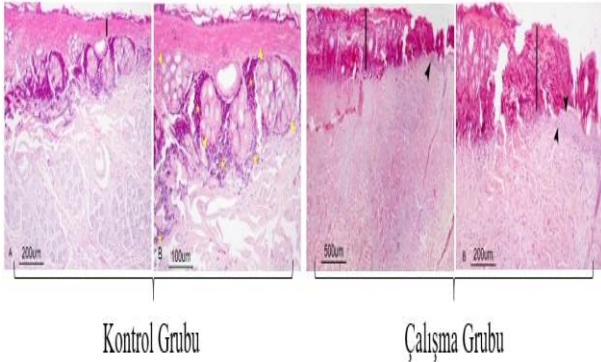
\*p<0.05: istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

**Şekil 1.** Çalışma grubunun 3., 7., 14. ve 21. gün termal ve normal deri görüntüleri**Figure 1.** Thermal images of the study group on the 3rd, 7th, 14th and 21st days.**Şekil 2.** Kontrol grubunun 3., 7., 14 ve 21. gün termal ve normal deri görüntüleri**Figure 2.** Thermal images of the control group on the 3rd, 7th, 14th and 21st days.

## Histopatolojik Bulgular

### 7. Gün Bulguları

Kontrol grubunda yanık bölgesinde (I) işaretiyle gösterilen yerde yanık kenarlarından da dahil olmak üzere epidermiste rejenerasyon gözlenmezken, çalışma grubunda siyah oklarla gösterilen yerde yanık bölgesinin her iki uçtaki kenarlarından başlayarak nekrotik alan altında ilerleyen kısmi epidermal rejenerasyon dikkati çekmektedir. Kontrol grubunda dermiste nekroz alanları, çoğunluğunu eozinofil lökositlerin oluşturduğu lökositlerle kuşatılmış olarak görünürken (İnflamasyon evresi); çalışma grubunda nekrotik kıl follikülleri ve ter bezlerinin hayali sınırları ile, dejeneratif-nekrotik bölgelerin hemen altındaki dermiste eozinofil lökosit infiltrasyonu ve ödem saptanmıştır (İnflamasyon - Proliferasyon Evresi) (Şekil 3).

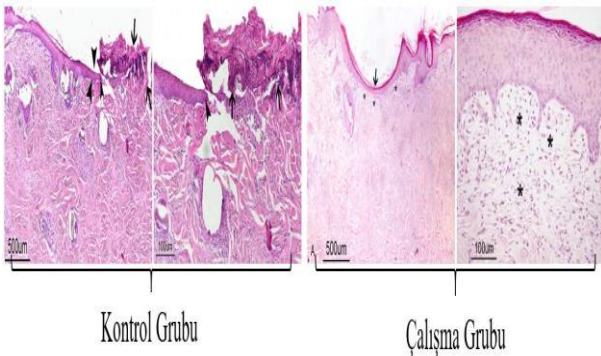


**Şekil 3.** Kontrol ve çalışma grubu 7. gün H&E.

**Figure 3.** Control and study group 7th day H&E.

### 14. gün bulguları

Kontrol grubunda yanık bölgelerinde ok başlarıyla gösterilen yerlerde yanık kenarlarından başlayan epidermisteki rejenerasyonun orta bölgeye doğru ilerlediği ve orta bölgede oklarla gösterilen alanlarda henüz rejenerasyon oluşmadığı ayrıca nekrotik bir kitle ile örtülü olduğu görülürken (İnflamasyon- Proliferasyon Evresi); çalışma grubunda yanık kenarlarından başlayan epidermisteki rejenerasyonun tamamlandığı fakat epidermal rejenerasyon henüz düzleşmediği ve konkav görünüme sahip olduğu görüldü (oklarla gösterilen alan). Aynı zamanda çalışma grubunda dermiste de anjiyogenezis ve lökositlerden fakir fibroblast proliferasyonu gözlemlendi. Yıldız ile gösterilen alanlarda dermisteki reaksiyon bu görünümüyle gevşek bir bağ doku proliferasyonu şeklindedir (Proliferasyon-Remodeling Evresi) (Şekil 4).

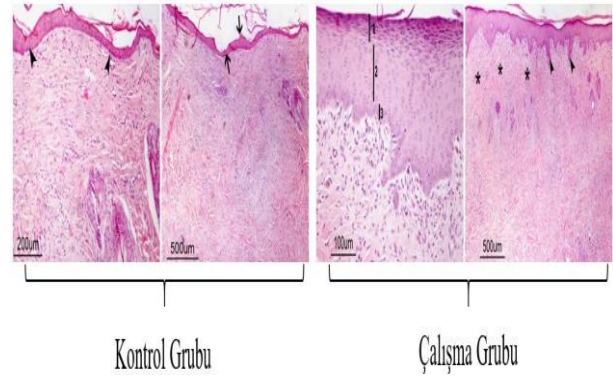


**Şekil 4.** Kontrol ve çalışma grubu 14. gün H&E.

**Figure 4.** Control and study group 14th day H&E.

### 21. gün bulguları

Kontrol grubunda yanık bölgesinde oklarla gösterilen alanlarda, yanık kenarlarından başlayan epidermisteki rejenerasyonun tamamlandığı, ancak rejenerasyonun henüz iç konkav görünümde olduğu ve epitel katının gelişmesinin de yetersiz olduğu görülürken, ok başları ile belirtilen alanlarda dermiste kısmen gevşek bir bağ doku proliferasyonu gözlenmektedir (Proliferasyon-Remodeling Evresi); bunun yanında çalışma grubunda yanık bölgesinde oklarla gösterilen alanlarda, epidermisteki rejenerasyonun tamamlandığı ve çoğunlukla düzleştiği, epitel katının da oldukça kalın olduğu, hatta dermise doğru da papiller uzantılar oluşturduğu görülmektedir. Ayrıca rejenerasyonun epidermal katta stratum corneum (1), stratum spinosum (2) ve stratum basale (3) tabakalarının belirgin bir şekilde olduğu ve yıldızla gösterilen alanlarda ise dermiste daha sıkı bir bağ doku proliferasyonu gözlenmektedir (Remodeling) (Şekil 5).



**Şekil 5.** Kontrol ve çalışma grubu 21. gün H&E.

**Figure 5.** Control and study group 21st day H&E.

Bu çalışmada, çalışma grubu ile kontrol grubu histopatolojik olarak karşılaştırıldığında; çalışma grubunda epitelizasyonun, kontrol grubuna göre daha erken başladığı ve daha erken tamamlandığı, ayrıca kollejenizasyonun da daha güçlü şekillendiği saptandı.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kızılötesi termografi, normal ve lezyonlu derideki kan akışı değişikliklerini saptamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Yanık yarası oluştuktan sonraki 3 gün içinde yanık derinliğini tahmin etmede termografi çok yararlıdır. Yanıklar değerlendirilirken, kızılötesi radyasyon algılanması yara yüzeyindeki kutanöz kan akışı ile ilişkilidir ve dolaylı olarak yanık derinliği hakkında bilgi verir. Deri kan damarlarında ortaya çıkan hasar, yüzeysel deri kan akışında bir azalma veya durmaya yol açar ve bu da yüzey sıcaklığının düşmesine neden olur. Derin yanık yaraları, yüzeysel olanlardan daha soğuktur. Yüzeysel yaralarda vasküler perfüzyon daha azdır. Bu nedenle, termografide ölçülen sıcaklık derinlikle ters yönde ilişkilendirilir (Cole ve ark. 1991; Liddington ve Shakespeare 1996; Monstrey ve ark. 2008). Hardwicke ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada 2. derece yanık yarasında, ilk üç gün yapılan ölçümlerde 2. gündeki yanık bölgesi ile normal deri arasındaki ortalama sıcaklık farkı ortalama  $-1.2^{\circ}\text{C}$ 'dir. Yapılan bu çalışmada da, her iki grupta yanık yarası ile normal deri arasındaki sıcaklık farkı 2. gün sonrası yapılan ölçümlerde ortalama  $-1.2^{\circ}\text{C}$  olarak tespit edilmiştir. Bu sıcaklık farkı lezyonda ikinci derece yanık yarası oluştuğunu göstermektedir ( $p < 0.05$ , Tablo 1, Tablo 2). Bu veriler Hardwicke ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışma bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Ayrıca Renkielska ve ark. (2005) ile Renkielska ve ark. (2006)'nın gerçekleştirdiği çalışmalarda, her grup içinde işlem sonrasında üç günde alınan ölçümlerin birbirleriyle olan karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgularda her iki grup için de ilk üç gündeki karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 2). Sonuçların Renkielska ve ark. (2005) ve Renkielska ve ark. (2006)'nın çalışmalarıyla benzer olduğunun saptanması çalışmanın doğru planlandığını göstermektedir.

E-TZF, büyüme faktörlerinin (PDGF-AA, PDGF-AB, EGF ve IGF-1) lezyonlu alana göçünü hızlandırır. Bu büyüme faktörleri, uygulamadan 15 dakika sonra bölgeye hareket ederler. Bundan sonraki 10 günde giderek azalacak biçimde salınırlar (Fujioka-Kobayashi ve Miron 2017).

Yanık yarası oluşturulduktan sonra derideki kan damarları yıkımlanır, buna bağlı olarak yaralar daha soğuk görünür. Ancak 3 gün sonra sıcaklık artmaya başlar. Bu ısınmanın nedeni, granülasyon dokusu şekillenmesi için ortaya çıkan vasküler gelişmeyle ilintilidir. Derin yanıklarda ise bu iyileşme yavaş şekillenmektedir (Liddington ve Shakespeare 1996). Bu çalışma sırasında elde edilen termografik bulgulara göre, yanık yarası ile normal deri arasındaki sıcaklık farkı çalışma grubunda işlemden sonraki 3. günden itibaren kontrol grubuna göre daha fazla azalmaya başladığı saptanmıştır. Bu bulgu E-TZF'nin etkilerine bağlı olarak hücresel aktivitenin çalışma grubunda, kontrol grubuna göre daha hızlı olduğunun bir kanıtıdır. Yedinci ve ondördüncü günde gerçekleştirilen histopatolojik bulgulara hücresel aktivitenin çalışma grubunda daha fazla gerçekleştiğinin tespit edilmesi bu çalışmanın önemli sonuçlarıdır. Çalışma grubunda E-TZF uygulanan yanık yaralarının 7. günde normal deriyle aynı seviyelerde, 14. günde ise normal deriye göre daha sıcak olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ , Tablo 2). Kontrol grubunda ise bu sıcaklık farkı daha az miktarda şekillenmiştir. Liddington ve Shakespeare (1996) kısmi kalınlıktaki yanık yaralarında su geçirmez membran uygulaması yapmış ve uygulamadıklarına göre 3. günden itibaren yanık yarası sıcaklığının daha fazla artmaya başladığını belirlemiştir. Bu çalışmada da E-TZF uygulanan yanıklardaki sıcaklık artışı uygulanmayanlara göre daha fazla şekillenmiştir. Bu bulgular Liddington ve Shakespeare (1996)'in bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Kılsız hayvanlarda yayılan kızılötesi radyasyon deri yüzey sıcaklığı tarafından yönetilir, ancak çoğu memeliden yayılan radyasyon ya deri ya da kıllar tarafından tamamen engellenebilir. Kılların yüzeyinden yayılan sıcaklık farkı, deri ile kıl örtüsü yüzeyi arasındaki sıcaklık gradyanı aracılığıyla belirlenir. Kalın kürklü hayvanlarda, infrared termal kamera ile ölçülen yüzey sıcaklığı, kıl örtüsünün fiziksel yüzeyinin birkaç milimetre altındadır. Bir memelinin yüzey sıcaklığı yalnızca deri sıcaklığından etkilenmez, aynı zamanda bu etkilenmede vücudun farklı bölgelerindeki kılların kalınlığı, yoğunluğu ve kalitesi de rol oynar. Bu durum farklı türler arasında, mevsime bağlı deride gelişen yüzeysel dökülmeler ya da tüy dökme nedeniyle değişmektedir (McCafferty 2007). Bu çalışmanın 21. gününün her iki grup verileri yanık yarası ile normal deri arasında sıcaklık farkının çok daha fazla oranda olduğunu ortaya koymuştur ( $p<0.05$ , Tablo 1, Tablo 2). Bu bulgu tavşanların yara çevresindeki kıllarının uzamaya başladığı döneme denk geldiği için kılların normal deri sıcaklığını daha düşük gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Yara iyileşmesinde dermal veya subdermal enjekte edilen konsantre trombositler veya onların büyüme faktörleri oldukça etkili otolog kollajen gelişimi sağlar. Otolog büyüme faktörleri ile fibroblast stimülasyonu dermiste ya da dermal-subdermal birleşme noktasında kollajen birikimini uyularak, sağaltımdan birkaç hafta sonra bile faydalı bir etki gösterir (Sclafani 2010). E-TZF'nin yapısında bulunan kan hücrelerinin çoğu lökositler (monositler, nötrofiller, lenfositler) ve trombositlerdir. Ayrıca bunların yanında dolaşımdaki kök hücreler ve endotel hücreleri de E-TZF'nin yapısında bulunmaktadır (Ciravegna 2016). Trombositten zengin fibrinin bir sonraki adımı olarak E-TZF, gelişmiş trombositten zengin fibrinin özelliklerini sıvı şekilde sunar. Ayrıca E-TZF kandan bir miktar da kök hücre yakalar. Çeşitli otolog büyüme faktörlerini içeren E-TZF, bunları sürekli ve yavaş serbest bırakır (Melek ve El Said 2017). E-TZF'nin diğer bir avantajı, enjeksiyon sonrası hemen pıhtılaşarak bir biyomateryal oluşturmasıdır. Ayrıca kovalent olmayan birleşme için herhangi bir biyomateryal ile kombine edilebilir (Masoudi ve ark. 2016).

Özçelik (2009)'in 2. derece yanık yarasında yaptığı çalışmada yara bölgesine enjekte ettiği trombositten zengin plazma sayesinde fibroblast aktivasyonunu ve kollejenizasyonu artırdığını savunmaktadır. Bu çalışmada 1. gruptaki histopatolojik örnekler göre 14. günde fibroblast aktivasyonunun başladığı gözlemlenmiştir. 21. günde fibroblast aktivasyonuna bağlı olarak güçlü bir kollejenizasyonun şekillendiği ortaya konulmuştur. Ancak 14. günde kontrol grubu örnekleri incelendiğinde ise; fibroblast aktivitesinin başlamadığı tespit edilmiştir. Bu bulgular Özçelik (2009)'in çalışmasıyla benzerlik göstermekte ve yeni yapılacak çalışmalar için oldukça kanıt verici olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca Subrahmanyam (1998) 2. derece yanık yarası sağaltımı için bal kullandığını belirtmektedir. Çalışmasının 7. gününde epitelizasyonun sağlandığı ve 21. günde tamamlandığı vurgulanmaktadır. Subrahmanyam'ın çalışma bu çalışmanın sonuçları epitelizasyon açısından birbirine benzerdir. Yüksel (2012)'in ratlarda 2. derece yanık oluşturarak gerçekleştirdiği çalışmada %0,9' luk sodyum klorür, %1' lik gümüş sülfadiazin ve %10' luk povidon iyot kullandığını belirtmektedir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre; 7., 14., ve 21. günlerde epitelizasyon ve kollejenizasyon açısından grupların hiçbirinde birbirine göre fark oluşmadığı belirtilmiştir. Her üç grupta elde edilen 7. gün (yangı hücreleri artışı), 14. gün (kollejen artışı ve epitelizasyon başlangıcı) ve 21. gün (kollejenizasyonun epitelizasyonun ilerlemesi) bulguları bu çalışmanın kontrol grubundaki verilerle benzerlik göstermektedir. Yapılan bu çalışmada, çalışma grubunda tavşanlarda uygulanan E-TZF, ratlarda uygulanan %1' lik gümüş sülfadiazin ve %10'luk povidon iyota kıyasla daha hızlı bir yara iyileşmesine katkı sağlamıştır.

Buz (2012)' un parsiyel kalınlıktaki yanık yaralarının (2. derece yanık) sağaltımı için gerçekleştirdiği çalışmasında taurin, L-karnitin ve glutasyonu mezoterapik ajan olarak uyguladığını belirtmektedir. Böylelikle çalışma grubunda uyguladığı mezoterapik ajanların kontrol grubuna göre epitelizasyon ve kollejenizasyonu artırdığı, ancak 22. günde alınan örneklerin değerlendirilmesinde taurin, L-karnitin ve glutatyonun kollejenizasyonu ve epitelizasyonu yüzeysel olarak şekillendirdiği belirtilmektedir. Buz (2012)' un ratlarda elde ettiği sonuçlar ile tavşanlardaki bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında E-TZF'nin; taurin, L-karnitin ve glutatyonu göre yara iyileşmesinde kollejenizasyon ve epitelizasyonu önemli ölçüde artırdığını göstermektedir.

Bu çalışmada 7., 14. ve 21. günde alınan örneklerden yapılan histopatolojik incelemeler sırasında; E-TZF uygulanan olgulardan alınan örneklerde epitelizasyonun kontrol grubuna göre daha önce başladığı (inflamasyon evresinin tamamlandığı ve proliferasyon evresine geçildiği) (7. günde), devam ettiği (remodeling evresine geçtiği) ve 21. günde tamamlandığı (remodeling evresi) ortaya konulmuştur. Kontrol grubunda ise, epitelizasyonun yetersiz düzeyde olduğu (inflamasyon ve proliferasyon evrelerinin çalışma grubuna göre geç tamamlandığı, 21. günde remodeling evresinin ise henüz tamamlanmadığı) saptanmıştır. Bu şekilde E-TZF uygulanan yanık yaralarında yara iyileşme evrelerinin epitel onarımının daha hızlı şekillendiği belirgin bir şekilde gözlenmiştir.

Çalışmanın sonunda elde edilen bulgular ışığında; E-TZF yapısında herhangi bir katkı maddesi bulunmaması, kanının doğrudan santrifüjlenmesiyle elde edilen otolog, doğal bir ürün olarak uygulanabilirliğinin ortaya konması, düşük maliyetli olması, hazırlanması ve uygulanması diğer trombosit konsantrasyon yöntemlerine göre daha hızlı ve kolay olması ve en önemlisi yanık yaralarında epitelizasyonu ve kolajenizasyonu stimüle eden bir ürün olduğunun tespit edilmesi E-TZF'nin avantajları olarak sıralanabilir. E-TZF'nin bütün bu yararları göz önüne alındığında yumuşak doku lezyonlarında kolaylıkla uygulanabileceği ve sonuç olarak E-TZF'nin yanık yaralarında iyileşme sürecini hızlandırdığı kanaatine varılmıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TDK-2016-5421 nolu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aksoy N (2015).** Yanıklı hastada hemşirelik bakımının yönetimi. *Selçuk Tıp Derg*, 31, 47-51.
- Alan A (2012).** Termografi ve veteriner hekimliğinde kullanımı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 9, 2, 133-140.
- Arslan K, Karahan Ö, Okuş A et al. (2012).** Yanık yarası tedavisinde topikal çinko oksit ile gümüş sülfadiazinin karşılaştırılması. *Ulus Travma Derg*, 18 (5), 376-383.
- Aydınuyurt HŞ, Sancak T, Taskin C, Başbuğan Y, Akıncı L (2020).** Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodontitis in rats. *Odontology*, <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00557-1>
- Buz A (2012).** Parsiyel Kalınlıkta Termal Yanıkların Tedavisinde Mezoterapinin Etkinliği- DeneySEL Çalışma. Uzmanlık Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Zonguldak.
- Ciravegna J (2016).** Le PRF dans les techniques de chirurgie plastique parodontale: un réel bénéfice? Doktora Tezi, Nice.
- Cole RP, Shakespeare PG, Chissell HG, Jones SG (1991).** Thermographic assessment of burns using a nonpermeable membrane as wound covering. *Burns*, 17, 2, 117-122.

- Çetinkale O (1997).** Yanıklara ilk yaklaşım. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Acil Hekimlik Sempozyumu, 255-268.
- Düzgün D, Or ME (2009).** Termal kameraların tıpta veteriner hekimlikte kullanımı. *TÜBAV Bilim Derg*, 4, 468-475.
- Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ (2017).** Biological Components of Platelet Rich Fibrin: Growth Factor Release and Cellular Activity In: Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications, Miron RJ, Choukron J (Eds), John Wiley & Sons Ltd, USA.
- Gurtner GC, Wong VW (2007).** Wound Healing: Normal And Abnormal. In: Grabb and Smith's Plastic Surgery, 6th Edition, Thorne CH, Beasley RW, Aston SJ, Barlett SP, Gurtner GC, Spear SL (Eds), Lippincott-Williams and Wilkins, USA.
- Hardwicke J, Thomson R, Bamford A, Moimen N (2013).** A pilot evaluation study of high resolution digital thermal imaging in the assessment of burn depth. *Burns*, 39, 76-81.
- Jameson CA (2007).** Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. *Labmedicine*, 38 (1), 39-42.
- Liddington MI, Shakespeare PG (1996).** Timing of the thermographic assessment of burns. *Burns*, 22, 1, 26-28.
- Masoudi EA, Ribas J, Kaushik G et al. (2016).** Platelet-rich blood derivatives for stem cell-based tissue engineering and regeneration. *Curr Stem Cell Rep*, 2, 33-42.
- McCafferty DJ (2007).** The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions. *Mammal Rev*, 37, 3, 207-223.
- Melek LN, El Said MM (2017).** Evaluation of "Autogenous Bioengineered Injectable PRF - Tooth graft" combination (ABIT) in reconstruction of maxillary alveolar ridge defects: CBCT volumetric analysis. *SJDR*, 8, 86-96.
- Monstrey S, Hoeksema H, Verbelen J, Pirayesh A, Blondeel P (2008).** Assessment of burn depth and burn wound healing potential. *Burns*, 34, 761-769.
- Mourão CF, Valiense H, Melo ER, Mourão NB, Maia MD (2015).** Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*, 42, 421-423.
- Özçelik Ü (2009).** Kısmi Kalınlıkta Yanık Sonrası Trombosit Zengin Plazmanın Lokal Uygulanmasının Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri. Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Özkaya NK, Alğan S, Akkaya H (2014).** Yanıklı Hastanın Değerlendirilmesi ve Tedavi Yaklaşımının Belirlenmesi. *Ankara Med J*, 14 (4), 170-175.
- Özkorkmaz EG, Özay Y (2009).** Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2 (2), 63-67.
- Parsak CK, Sakman G, Çelik Ü (2007).** Yara iyileşmesi, yara bakımı ve komplikasyonları. *Arşiv*, 16, 145-159.
- Renkielska A, Nowakowski A, Kaczmarek M, et al. (2005).** Static thermography revisited—An adjunct method for determining the depth of the burn injury. *Burns*, 31, 768-775.
- Renkielska A, Nowakowski A, Kaczmarek M, Ruminski J (2006).** Burn depths evaluation based on active dynamic IR thermal imaging-A preliminary study. *Burns*, 32, 867-875.
- Ring EF, Ammer K (2012).** Infrared thermal imaging in medicine. *Physiol Meas*, 33, 33-46.
- Sclafani AP (2010).** Platelet-rich fibrin matrix for improvement of deep nasolabial folds. *J Cosmet Dermatol*, 9, 66-71.
- Subrahmanyam M (1998).** A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. *Burns*, 24, 157-161.
- Weibrich G, Kleis WKG, Kunz-Kostomanolakis M, loos AH, Wagner W (2001).** Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *J Oral Maxillofac Surg*, 16 (5), 693-699.
- Yüksel EB (2012).** Rat Yanık Yarasında Gümüş Sülfadiazin, Povidon İyot ve İzotonik Sodyum Klorür Etkisinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ.



## Prevalence of Gastrointestinal Parasitic Infections in Sheep and Goats of Sandwip Island, Chattogram, Bangladesh

Mrinmoy BHOWMIK<sup>1</sup> Mohammad Amir HOSEN<sup>2</sup> Mohammad Abdullah Al MAMUN<sup>1</sup>  
Farazi Muhammad Yasir HASIB<sup>1</sup> Sonnet PODDAR<sup>3</sup> Mohammad Alamgir HOSSAIN<sup>1</sup>  
Mohammad Abdul ALIM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chattogram Veterinary and Animal Sciences University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Parasitology, Chattogram, Bangladesh

<sup>2</sup> Veterinary Surgeon, Department of Livestock Services, Sandwip, Chattogram, Bangladesh

<sup>3</sup> Chattogram Veterinary and Animal Sciences University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy and Histology, Chattogram, Bangladesh

Received: 07.11.2020

Accepted: 17.11.2020

### ABSTRACT

Gastrointestinal (GI) parasitic infection is considered a common problem in sheep and goat production in Bangladesh. The current investigation was undertaken to determine the prevalence of GI parasitic infection and its associated risk factors (e.g., age, sex, body condition & deworming status etc.) in sheep and goats of the Sandwip Island, Chattogram, Bangladesh. A total of 330 faecal samples of which 220 sheep and 110 goats were taken using a random sampling method. All the samples were subjected to routine coproscopy (e.g., direct smear, flotation and sedimentation) to detect the eggs/oocysts of helminths and protozoan parasites. Results demonstrated that the overall prevalence of GI parasitic infections was 68.64% in sheep and 61.82% in goats. The frequency of nematodes and trematodes was higher in comparison to cestodes and protozoan infections in both sheep and goats of all the three study areas. Adult goats had demonstrated significantly higher GI parasitic infections in comparison to the young population. Female sheep were more prone to GI parasitic infections whereas the opposite trend was noticed for goats. The sheep and goats having the 'poor' body condition score/nutritional status were more susceptible to parasitic infections compared to moderate and good health conditions. Rarely or non-dewormed sheep and goats also harboured more GI parasites compared 'dewormed animals'. The current research is the first in terms of species identified in study areas, therefore, we recommended extensive studies including epidemiological and molecular approaches to identify GI parasitic diseases and their associated risk factors.

**Keywords:** Gastrointestinal parasitic infection, Goat, Prevalence, Sheep

### ÖZ

### Bangladeş, Chattogram, Sandwip Adası'ndaki Koyun ve Keçilerde Gastrointestinal Parazit Enfeksiyonlarının Prevalansı

Gastrointestinal (GI) parazit enfeksiyonu, Bangladeş'te koyun ve keçi yetiştiriciliğinde yaygın bir sorun olarak kabul edilmektedir. Mevcut araştırma, Bangladeş'in Chattogram yöresindeki Sandwip Adası koyun ve keçilerinde GI parazit enfeksiyon prevalansını ve ilişkili risk faktörlerini (örneğin, yaş, cinsiyet, beslenme ve parazitlerden arındırma durumu vb.) belirlemek için yapıldı. Rastgele örnekleme yöntemiyle 220 koyun ve 110 keçi olmak üzere toplam 330 dışkı örneği alınmıştır. Helmintlerin ve protozoan parazitlerin yumurtalarını / ookistlerini tespit etmek için tüm numuneler rutin dışkı muayenesine (örn., Doğrudan yayma, yüzdürme ve sedimentasyon) tabi tutulmuştur. Sonuçlar, GI parazit enfeksiyonların genel prevalansının koyunlarda %68.64 ve keçilerde %61.82 olduğunu göstermiştir. Nematod ve trematod prevalansı, üç çalışma alanının her ikisinde de hem koyun hem de keçilerde cestod ve protozoan enfeksiyonlarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Yetişkin keçiler, genç popülasyona kıyasla önemli ölçüde daha yüksek GI parazit enfeksiyonları göstermiştir. Dişi koyunlar GI parazit enfeksiyonlarına daha yatkın olmasına rağmen, keçilerde bunun tersi bir eğilim tespit edildi. Vücut kondisyon puanı / beslenme durumu kötü olan koyun ve keçiler, orta ve iyi sağlık koşullarına göre parazit enfeksiyonlara daha duyarlı olduğu belirlendi. Nadiren arındırılmış ya da parazitlerden arındırılmamış koyun ve keçiler, "parazitlerden arındırılmış hayvanlara" kıyasla daha fazla GI paraziti barındırdığı ortaya konmuştur. Mevcut araştırma, çalışma alanlarında tespit edilen türler bakımından ilkidir, bu nedenle, GI parazit hastalıkları ve bunlarla ilişkili risk faktörlerini tanımlamak için epidemiyolojik ve moleküler yaklaşımları içeren kapsamlı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gastrointestinal parazit enfeksiyon, Keçi, Prevalans, Koyun



## INTRODUCTION

In Bangladesh, livestock is considered a crucial sub-sector of agriculture. It plays a potential role in improving human health and promoting the national economy of the country. The population of cattle, buffalo, goats and sheep was 24.24, 1.50, 26.27 and 3.54 million, respectively. The contribution of livestock to Gross Domestic Product in Bangladesh was approximately 1.47% and livestock in agricultural production was 13.46%. About 20% of the population is directly and 50% indirectly depend on the livestock sector (Anonymous 2019).

Sheep and goat are one of the important components of livestock. They are commonly affected by various diseases including many gastrointestinal (GI) parasites like helminths and protozoa. These GI parasitic infections are believed to be one of the key impediments that hinder the growth and productivity and may seriously affect the health of the animals (Radostits et al. 1994; Githigia et al. 2001; Murthy and Rao 2014). Acute cases of GI parasitic infections may cause death without showing any clinical sign whereas chronic cases involve loss of appetite, loss of condition, diarrhoea, weight loss, anaemia and bottle jaw including deaths of the animals (Soulsby 1982; Radostits et al. 1994). Further, GI parasitic infections increase the cost of production by adding an extra expense associated with preventive and control measures (Silvestre et al. 2000). There are many associated risk factors involve in the occurrence of GI parasitic infections are species, age and gender, body condition of the animals, flock size, housing and rearing system, body deworming status of the animal, distribution of parasite species, in an area, the topography of an area etc. (Tariq et al. 2010; Alim et al. 2012; Dey et al. 2020).

Sandwip Island is a sub-district under Chattogram district of Bangladesh. It has a total area of 762.42 square kilometres (km) with an about 100 km coastal belt (low-laying and salty areas). This tiny island comprises a population of 0.279 million (BBS, 2013) and a significant proportion of this population is largely depending on livestock rearing (e.g., cattle, buffalo, sheep and goats) for their livelihood (BBS, 2013). Interestingly, the socio-ecological conditions and unique nature of the of this island favours the rearing of sheep and goats irrespective of other livestock species. It is considered that GI parasitic infections in this area mostly impairs the growth and productivity of the sheep and goat population. To the best of our knowledge, there is no published study in the literature on determination of the GI parasitic infections in this island including their epidemiological information. A proper addressing the epidemiology of parasitic diseases is a prerequisite for the rational designing of the effective preventive and control measures against them. Therefore, the present study was undertaken to explore the prevalence and associated risk factors of GI parasitic infections in sheep and goats of some selected areas of Sandwip Island.

## MATERIALS and METHODS

### Study period and areas

The current investigation was undertaken for a period of 3 months (June-August 2019) in the Sandwip Island (Latitude: 22°22' N - 22°34' N, Longitude: 91°26' E - 91°34' E), a sub-district of Chattogram, located along the southeastern coast of Bangladesh. We have considered three unions namely as Bauria, Magdhara and Santoshpur

of this island and all these areas represent the low-laying with salty areas.

### Study design

A cross-sectional study with the random sample collection technique was considered to perform the current investigation. All demographic data (e.g., owner's name and address, species, age, sex, nutritional status, deworming history of the animals etc.) were collected through a pre-structured questionnaire. The age determination of sheep and goats was performed by the standard dentition methods and categorized as an 'adult' ( $\geq 1$  year) and 'young' ( $< 1$  year) (Banerjee 1964). The animals were examined for body condition score (BCS) on 1 (one) to 5 (five) scale described by previously published methods (Kenyon et al. 2014; Ghosh et al. 2019). Based on the BCS, animals were categorized into three groups as 'poor' (BCS 1- $< 2$ ), 'moderate' (BCS  $\geq 2$ -3) and 'good' health (BCS  $> 3$ ). The animals that dewormed (at least 3-6 months before) were grouped as 'dewormed animals' and those were not dewormed considered as 'non-dewormed animals'. Moreover, the individual sheep and goat was taken as a sampling unit in this investigation.

### Faecal sample collection, preservation and examination

A total of 330 faecal samples of which 220 sheep and 110 goats were collected. Standard protocols were followed during sample collection and preservation (Hendrix and Robinson, 2006). Briefly, around 5-10 g of rectal or freshly voided faeces was collected from each animal, kept in a plastic specimen container and preserved with 10% formalin at 4°C until further analyses. The samples were tested following routine tests (e.g., direct smear, flotation and sedimentation) to identify the morphological features of eggs/oocysts of helminths and protozoan parasites, respectively (Soulsby 1982; Urquhart et al. 1996; Hendrix and Robinson 2006). Shortly, the individual samples were first homogenized and undigested materials were removed through straining of the faecal suspension. The direct smear was then performed by taking a drop of faecal suspension on a glass slide. For floatation technique, 5 mL of faecal suspension was taken in a 20 mL test tube. Then, the rest of the volume of the test tube was filled with the sugar salt floatation fluid and a coverslip was put on the convex meniscus. After 15 min, the coverslip was removed and placed on the glass side for examination under the microscope. For sedimentation method, the faecal suspension was kept stand-still for 10-15 min and a drop of sediment was then examined after discarding the supernatant. Duplicate smears were prepared for each of the specimen tested. We considered a sample 'positive' when at least one egg or oocyst was detected in that smear examined. However, parasite species were detected up to the genus level and the 'Strongyle-type' eggs indicated when the eggs of parasite genera under the superfamily Trichostrongyloidea (e.g., *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus*) was detected (Urquhart et al. 1996).

### Statistical analysis

The collected data was processed and coded appropriately using Microsoft Excel-2016™. STATA™ 15.1 (Stata Corporation College Station, Texas) software was used for statistical analysis and graphs were prepared using the GraphPad Prism 7.03. The Chi-square test was done to determine the significant variation among the variables. The level of significance considered when \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$  and \*\*\* $P \leq 0.001$ .



## RESULTS

### Overall prevalence of gastrointestinal parasitic infections

In the current investigation, we detected 2 (two) genera of trematodes, 1 (one) genus of cestodes and 3 (three) genera of nematodes and 1 (one) genus of protozoa (Table 1). The overall prevalence of gastrointestinal (GI) parasitic infections was 68.64% in sheep, whereas it was 61.82% in goats (Table 1). The overall infection rate caused by nematodes (sheep, 54.55 vs goats, 33.64, %,  $P=0.000$ ) was higher compared to trematodes (sheep, 21.82 vs goats, 39.09, %,  $P=0.001$ ), cestodes (sheep, 2.27 vs goats, 4.55, %,  $P=0.256$ ) and protozoan infection (sheep, 1.36 vs goats, 7.27, %,  $P=0.005$ ). Among species-specific GI parasites, *Fasciola* spp., *Paramphistomum* spp., *Moniezia* spp., *Trichuris* spp., and *Eimeria* spp., infections were comparatively higher in goats in comparison to sheep, but it was opposite in case of Strongyle-type parasites and *Strongyloides* spp. infection (Table 1).

### Area-wise prevalence of gastrointestinal parasitic infections

The overall frequency of GI parasitic infections was the highest in Bauria (73.17%), followed by Magdhara

(69.81%) and Santoshpur (56.46%) which were statistically significant ( $P=0.009$ ). Among the areas, the occurrence of nematodes was more common in sheep of Magdhara (62.26%) compared to other areas (Figure 1A). In goats, nematodes were more prevalent in Magdhara (44.74%) and Santoshpur (43.33%), although trematodes were recorded more prevalent in Bauria (38.10%) (Figure 1 B). Protozoal infection (*Eimeria* spp.) was slightly higher in goats in all study areas (Figure 1B).

### Age-specific prevalence of gastrointestinal parasitic infections

The age-specific prevalence of GI parasitic infection was more in young sheep (70%) compared to adults (67.86%), although it was not statistically significant (Table 2). In contrast, adult goats (69.23%) had significantly higher GI parasitic infections compared to the young population (51.11%). *Paramphistomum* spp. infection was significantly higher in adult in comparison to young goats, although the trend was reverse in sheep. *Fasciola* spp. infection was higher in goats compared to its counterparts. Infection caused by Strongyle-type parasites was higher in both young sheep and goats. *Eimeria* spp. infection was significantly higher in adults compared to young goats (Table 2).

**Table 1.** Prevalence of gastrointestinal parasitic infections in sheep and goats

Parasites	Sheep (N=220)		Goats (N=110)	
	Prevalence (%)	95% CI	Prevalence (%)	95% CI
<i>Fasciola</i> spp.	13.18	9.3 - 18.2	29.09	21.4 - 38.1
<i>Paramphistomum</i> spp.	7.27	4.5 - 11.5	13.64	8.4 - 21.2
<i>Moniezia</i> spp.	2.27	0.9 - 5.2	4.55	1.9 - 10.2
Strongyles -types	37.27	31.1 - 43.8	25.45	18.2 - 34.3
<i>Strongyloides</i> spp.	28.64	23.0 - 34.9	10.00	5.6 - 17.0
<i>Trichuris</i> spp.	0.91	0.2 - 3.2	6.36	3.1 - 12.5
<i>Eimeria</i> spp.	1.36	0.4 - 39.3	8.18	4.3 - 14.8
Overall	68.64	62.2 - 74.4	61.82	52.4 - 70.3

N= total no. of animal; CI= Confidence interval

**Table 2.** Age-specific prevalence of gastrointestinal parasitic infections in sheep and goats

Parasites	Sheep			Goats		
	Young (%) (N=80)	Adult (%) (N=140)	P-value	Young (%) (N=45)	Adult (%) (N=65)	P-value
<i>Fasciola</i> spp.	12.50	13.57	0.821	20.00	35.38	0.081
<i>Paramphistomum</i> spp.	10.00	5.71	0.239	4.44	20.00	<b>0.019*</b>
<i>Moniezia</i> spp.	1.25	2.86	0.442	8.89	2.54	0.069
Strongyles-types	40.00	35.71	0.527	28.89	23.08	0.491
<i>Strongyloides</i> spp.	30.00	27.86	0.735	4.44	13.85	0.106
<i>Trichuris</i> spp.	0.00	1.43	0.283	4.44	7.69	0.493
<i>Eimeria</i> spp.	1.15	1.43	0.913	0.00	13.85	<b>0.009**</b>
Total	70.00	67.86	0.742	51.11	69.23	0.054

N= total no. of animal; level of significance \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$

**Table 3.** Health status related prevalence of gastrointestinal parasitic infections in sheep and goats

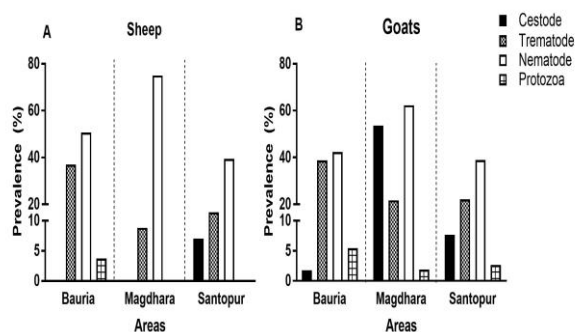
Parasites	Sheep				Goats			
	Poor (N=70) (%)	Moderate (N=44) (%)	Good (N=106) (%)	P-value	Poor (N=43) (%)	Moderate (N=37) (%)	Good (N=30) (%)	P-value
<i>Fasciola</i> spp.	18.57	9.09	11.31	0.254	32.56	24.32	30.00	0.715
<i>Paramphistomum</i> spp.	11.43	2.27	6.60	0.174	20.93	8.11	10.00	0.198
<i>Moniezia</i> spp.	2.86	0.00	2.83	0.528	11.63	2.70	3.33	0.614
Strongyles-types	50.00	47.73	24.53	<b>0.001**</b>	37.21	24.32	10.00	<b>0.031*</b>
<i>Strongyloides</i> spp.	45.71	15.91	22.64	<b>0.000***</b>	18.60	2.70	6.67	<b>0.047*</b>
<i>Trichuris</i> spp.	0.00	4.55	0.00	<b>0.018*</b>	11.63	2.70	3.33	0.193
<i>Eimeria</i> spp.	2.86	2.27	0.00	0.235	11.63	5.41	6.67	0.562
Total	91.43	68.36	56.60	<b>0.000***</b>	83.72	48.65	46.67	<b>0.001***</b>

N= total no. of animal; level of significance \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001

**Table 4.** Deworming status related prevalence of gastrointestinal parasitic infections in sheep and goats

Parasites	Sheep			Goats		
	Non-dewormed (N=150) (%)	Dewormed (N=70) (%)	P-value	Non-dewormed (N=45) (%)	Dewormed (N=65) (%)	P-value
<i>Fasciola</i> spp.	16.00	7.14	0.070	53.33	12.31	<b>0.030*</b>
<i>Paramphistomum</i> spp.	10.67	0.00	<b>0.005**</b>	31.11	1.54	<b>0.004**</b>
<i>Moniezia</i> spp.	3.33	0.00	0.122	6.67	3.08	0.966
Strongyles-types	31.33	50.00	<b>0.008**</b>	40.00	15.38	0.517
<i>Strongyloides</i> spp.	30.00	25.71	0.512	17.78	4.62	0.332
<i>Trichuris</i> spp.	0.00	2.86	<b>0.038*</b>	8.89	4.62	0.914
<i>Eimeria</i> spp.	2.00	0.00	0.234	17.78	1.54	0.058
Total	69.33	67.14	0.744	72.31	46.67	<b>0.006**</b>

N= total no. of animal; level of significance \*P<0.05 and \*\*P<0.01

**Figure 1.** Area-wise prevalence of gastrointestinal parasitic infections in sheep and goats

### Sex-specific prevalence of gastrointestinal parasitic infections

In the current study, the overall sex-specific prevalence of GI parasitic infections was higher in female (70.37%) compared to male sheep (63.79%), although the trend was opposite in goats (female, 60.29 vs 64.29, %, P=0.675). Female sheep was found comparatively less susceptible to *Fasciola* spp. (female, 11.73 vs 34.48, %, P=0.287) and *Strongyloides* spp. infection (female, 25.31 vs 37.93, %, P=0.287) compared to male. In female goats, the same trend was also observed in both *Fasciola* spp. (female, 27.94 vs 30.95, %, P=0.735) and *Strongyloides* spp. infections (female, 5.88 vs 16.67, %, P=0.067). Both female sheep and goats demonstrated higher susceptibility to Strongyle-type parasites and *Trichuris* spp. infection compared to their counterparts, although it did not reach to a significant (Supplementary table 1).

### Health status related prevalence of gastrointestinal parasitic infections

The animals having the 'poor' and 'moderate' health status was more prone to GI parasitic infections. The overall proportion of GI parasitic infections was significantly ( $P=0.000$ ) more in sheep with 'poor' (91.43%) followed by 'moderate' (68.36%) and 'good' (56.60%) health status (Table 3). Goats with the 'poor' (83.72%) health condition significantly ( $P=0.001$ ) suffered from GI parasitic infections compared to the goats with the 'moderate' (48.65%) and 'good' (46.67%) health conditions. In both sheep and goats with 'poor' health conditions, a significantly higher occurrence of Strongyle-type parasites, *Strongyloides* spp. infections were noticed (Table 3). However, the same trend was observed in the occurrence of *Fasciola* spp., *Paramphistomum* spp., *Moniezia* spp., and *Eimeria* spp. infections in both sheep and goats with 'poor' body condition score (Table 3).

### Deworming status related prevalence of gastrointestinal parasitic infections

The overall prevalence of GI parasitic infections based on deworming status demonstrated that 'non-dewormed' goats showed a significantly higher chance in the incidence of GI parasitic infections (72.31%) compared to the 'dewormed' goats (46.67%) (Table 4). In sheep, the trend was similar to the goats, although it was non-significant (Table 4). In the case of *Fasciola* spp. and *Paramphistomum* spp. infections in goats, the occurrence of GI parasitic infections significantly varied (Table 4). Similarly, the occurrence of *Paramphistomum* spp., Strongyle-type parasites and *Trichuris* spp. infections in 'dewormed' and 'non-dewormed' groups of sheep was significantly differed (Table 4).

## DISCUSSION

Gastrointestinal (GI) parasitic infections impair the growth and productivity of the sheep and goats. It may ultimately lead to serious health problems even the death of the animals (Kagira and Kanyari 2001). The overall prevalence of GI parasitic infections was 68.64% in sheep and 61.82% in goats, which indicate a high level of such infections in the study sites. A similar type of prevalence was reported in previously published reports (Asif et al. 2008; Rahman et al. 2017). However, the overall prevalence reported in this investigation was relatively lower than the findings of prior reports who reported 79-86% in sheep and 89-90% in goats of Noakhali district, Bangladesh and Punjab, India (Singh et al. 2017; Hossain et al., 2019). A lower occurrence was reported by Rajarajan et al. (2017) and Dagnachew et al. (2011) who reported 46% in sheep and 39 - 55% in goats of India and Ethiopia, respectively. The reason of differences in the frequency of GI parasitic infections could be due to sampling size, geographic locations, the climate of the study areas, breed of animals, anthelmintic treatment, flock size and management systems (Hassan et al. 2011; Zvinorava et al. 2016; Dappawar et al. 2018; Dey et al. 2020). This study further showed a lack of significant difference in the overall occurrence of GI parasitic infections between the study animals. This might be due to rearing of both sheep and goats together giving them a higher chance to be infected with those species of parasites through cross-contamination (Rahman et al. 2017). The species of GI parasites identified in the current investigation have also been reported in various places in Bangladesh (Hossain et al. 2015; Rahman et al. 2017). Area-wise variation of such GI parasite species might be due to different geographical

and climatic conditions necessary for the growth and development of infective stages and availability of intermediate hosts for those parasites (Zvinorova et al. 2016).

A significantly higher occurrence of nematodes infections in sheep and trematodes and protozoan infections in goats were observed in this investigation. A similar type of finding was demonstrated by the prior reports (Gorski et al. 2004; Dabasa et al. 2017). This difference might be due to the nature of the feeding of the animals. Sheep prefer to graze from the bottom compared to goats (which usually browse the tips of the grass) enable them to feed more larvae (Alderman et al. 1993; Silanikove 2000). Our findings showed discrepancy with the observation of Islam et al. (2017a) who observed a higher frequency of nematodes in goats and protozoan infections in sheep. This variation may be due to the availability of intermediate hosts, grazing practices and rearing systems (Sangma et al. 2013).

Adult goats of this study demonstrated a higher susceptibility to various GI parasites. On the contrary, there was no such specific trend in sheep. These findings were in line with the observations of Getachew et al. (2017) who observed no such significant difference in age groups. The mixed grazing and housing of both young and adult animals gave them a higher chance to be infected with those parasites through cross-contamination. However, Islam et al. (2017b) found a higher prevalence in young animals whereas, Rahman et al. (2017) and Singh et al. (2017) found a higher frequency in adults. Grazing, housing and managemental practices could be the reasons of such variation (Hassan et al. 2011; Dey et al. 2020).

The overall sex-specific prevalence of GI parasitic infections was higher in female in comparison to male sheep although the trend was opposite in goats. Observations of this study were partially in line with some previously published reports who also observed female animals were more prone to GI parasitic infections (Islam et al. 2017a; Singh et al. 2017). This could be due to an increase in the level of hormones like progesterone and prolactin during pregnancy and lactation makes female animal more vulnerable to any infection (Lloyd 1983). Further, some studies also demonstrated that the sex of the animals does have any significant association in the occurrence of gut parasites (Islam and Taimur 2008; Rahman et al. 2017; Dey et al. 2020). It could be due to the grazing practices in the study areas, mixed grazing and housing gave equal chances of all genders to be infected with gut parasites.

The poor health condition had a significant effect on the occurrence of GI parasitism in both sheep and goats as seen in the current investigation and other published reports (Islam et al. 2017a; Rahman et al. 2017; Dey et al. 2020). The animals with 'poor' health condition have low immunity to resist diseases including parasitic infections which might a probable reason of higher frequency of such parasitic infections (Watson et al. 1994).

Another important observation of this study was regularly dewormed sheep and goats had less occurrence of GI parasites compared to rarely or non-dewormed animals. This finding was in agreement with the prior reports where the authors recorded the lower parasitic infections in dewormed goats (Ratanapob et al. 2012; Dey et al. 2020). However, Kantzoura et al. (2012) did not find any significant co-relation in the occurrence of gut parasitic infections in 'dewormed' and 'non-dewormed' animals.

## CONCLUSION

The current investigation demonstrated a higher prevalence of GI parasitic infections in sheep and goats where the frequency of nematodes and trematodes was higher all the three study areas. Adult goats had significantly higher GI parasitic infections where female animals showed more susceptibility to infections. The 'health status' and 'deworming status' of sheep and goat are significant intrinsic factors in the occurrence of GI parasitic infections. However, this study considered a short period of time and didn't determine the seasonal variation of GI parasites. These limitations could be addressed by future studies. The data generated through this study has increased our understanding of the occurrence of GI parasites in the coastal areas like Sandwip Island. These findings help to take primary control and preventive measures to some extent against those parasitic diseases in the study areas.

## CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Alderman G, AFRC (1993).** Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisory Manual. CAB International, Wallingford, UK.
- Alim MA, Das S, Roy K, et al. (2012).** Prevalence of gastrointestinal parasitism in cattle of Chittagong division, Bangladesh. *Wayamba J Animal Sci*, 4, 1-8.
- Anonymous (2019).** Annual Report 2018-2019. Fisheries and Livestock Information Office, Ministry of fisheries and Livestock, Government of People's Republic of Bangladesh.
- Asif M, Azeem S, Asif S, Nazir S (2008).** Prevalence of Gastrointestinal Parasites of Sheep and Goats in and around Rawalpindi and Islamabad, Pakistan. *J Vet Anim Sci*, 1, 14-17.
- Banerjee GC (1964).** A Textbook of Animal Husbandry, 8th ed. Oxford and IBH Publishing CO. PVT. LTD., New Delhi.
- BBS (2013).** District Statistics 2011 Chittagong. Bangladesh Bureau of Statistics, Statistics & Informatics Division, Ministry of Planning, Government of The People's Republic of Bangladesh.
- Dagnachew S, Amamute A, Jemberu W (2011).** Epidemiology of gastrointestinal helminthiasis of small ruminants in selected sites of North Gondar zone, Northwest Ethiopia. *Ethiop Vet J*, 15 (2), 57-68.
- Dappawar MK, Khillare BS, Narladkar BW, Bhargale GN (2018).** Prevalence of gastrointestinal parasites in small ruminants in Udgir area of Marathwada. *J. Entomol Zool Stud*, 6 (4), 672-676.
- Dey AR, Begum N, Alim, MA, Malakar S, Islam MT, Alam MZ (2020).** Gastro-intestinal nematodes in goats in Bangladesh: a large-scale epidemiological study on the prevalence and risk factors. *Parasite Epidemiol Control*, 9, e00146.
- Getachew M, Tesfaye R, Sisay E (2017).** Prevalence and risk factors of gastrointestinal nematodes infections in small ruminants in Tullo district, Western Harerge. *Ethiopia. J Vet Sci Technol* 8 (2).
- Ghosh CP, Datta S, Mandal D, Roy DC, Roy A, Tudu NK (2019).** Body condition scoring in goat: impact and significance. *J Entomol Zool*, 7 (2), 554-560.
- Githigia SM, Thamsborg SM, Munyua WK, Maingi N (2001).** Impact of gastrointestinal helminths on production in goats in Kenya. *Small Rumin Res*, 42 (1), 21-29.
- Gorski P, Niżnikowski R, Strzelec E, Gajewska A, Popielarczyk D (2004).** Prevalence of protozoan and helminth internal parasite infections in goat and sheep flocks in Poland. *Arch Anim Breed*, 47, 43-49.
- Hassan MM, Hoque MA, Islam SKMA, Khan SA, Roy K, Banu Q (2011).** A prevalence of parasites in black bengal goats in Chittagong, Bangladesh. *Int J Livest Prod*, 2 (4), 40-44.
- Hendrix CM, Robinson E (2006).** Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians. Mosby Inc. and affiliated of Elsevier Inc.
- Hossain M, Bhuiyan MJU, Alam MS, et al. (2015).** Cross sectional epidemiological investigation on the prevalence of gastrointestinal parasites of small ruminants in Sullah upazilla of Sunamgonj district, Bangladesh. *J Adv Parasitol*, 2 (4), 100-104.
- Hossain MM, Hasib FMY, Bayzid M, Hassan MM, Hossain MA, Alim MA (2019).** Prevalence of gastrointestinal parasitic infections in sheep of coastal belt under Noakhali district, Bangladesh. *Bangladesh J Vet Anim Sci*, 7 (2), 32-37.
- Islam KS, Taimur MJFA (2008).** Helminthic and protozoan internal parasitic infections in free ranging small ruminants of Bangladesh. *Slov Vet Res*, 45 (2), 67-72.
- Islam MS, Hossain MS, Dey AR, Alim MA, Akter S, Alam MZ (2017a).** Epidemiology of gastrointestinal parasites of small ruminants in Mymensingh, Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res*, 4 (4), 356-362.
- Islam SS, Chakma S, Akhter AHMT, Ibrahim N, Sarker NH (2017b).** Livestock associated epidemiological information profiling in New Sandwip Island (Jahajcherchar) of the Meghna estuary, Noakhali using participatory disease searching tool. *J Adv Vet Anim Res*, 4 (3), 267-273.
- Kagira J, Kanyari PWN (2001).** The role of parasitic diseases as causes of mortality in small ruminants in a high-potential farming area in central Kenya. *J S Afr Vet Assoc*, 72 (3), 147-149.
- Kantzoura V, Kouam MK, Theodoropoulou H, Feidas H, Theodoropoulos G (2012).** Prevalence and risk factors of gastrointestinal parasitic infections in small ruminants in the Greek temperate mediterranean environment. *Open J Vet Med*, 2, 25-33.
- Kenyon PR, Maloney SK, Blache D (2014).** Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zealand J Agric Res*, 57 (1), 38-64.
- Lloyd S (1983).** Effect of pregnancy and lactation up on infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 4 (1-2), 153-176.
- Murthy GSS, Rao PV (2014).** Prevalence of gastro intestinal parasites in ruminants and poultry in Telangana region of Andhra Pradesh. *J Parasit Dis*, 38 (2), 190-192.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC (1994).** Veterinary Medicine: A text book of disease of cattle, sheep, pigs, goats and horse. Baillere Tindall Publication, London.
- Rahman MA, Labony SS, Dey AR, Alam MZ (2017).** An epidemiological investigation of gastrointestinal parasites of small ruminants in Tangail, Bangladesh. *J Bangladesh Agric Univ*, 15 (2), 255-259.
- Rajarajan S, Palanivel KM, Geetha M, Rani N (2017).** Epidemiology of Gastrointestinal Parasitism in Small Ruminants in Pudukkottai District, India. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6 (10), 4924-4930.
- Ratanapob N, Arunvipas P, Kasemsuwan S, Phimpraphai W, Panneum S (2012).** Prevalence and risk factors for intestinal parasite infection in goats raised in Nakhon Pathom Province, Thailand. *Trop Anim Health Prod*, 44 (4), 741-745.
- Sangma A, Begum NN, Roy BC, Gani MO (2013).** Prevalence of helminth parasites in sheep (*Ovis aries*) in Tangail district, Bangladesh. *J Bangladesh Agric Univ*, 10 (2), 235-244.
- Silanikove N (2000).** The physiological basis of adaptation in goats to harsh environment. *Small Rumin Res*, 35 (3), 181-193.
- Silvestre A, Chartier C, Sauve C, Cabaret J (2000).** Relationship between helminth species diversity, intensity of infection and breeding management in dairy goats. *Vet Parasitol*, 94 (4), 91-105.
- Singh E, Kaur P, Singla LD, Bal MS (2017).** Prevalence of gastrointestinal parasitism in small ruminants in western zone of Punjab, India. *Vet World*, 10 (1), 61-66.
- Soulsby EJJ (1982).** Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. London: Baillere Tindall.
- Tariq K, Chishti M, Ahmad F (2010).** Gastrointestinal nematode infections in goats relative to season, host, sex and age from the Kashmir valley. *Indian J Helminthol*, 84 (1), 93-97.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1996).** Veterinary Parasitology. Blackwell Science, United Kingdom.
- Watson DL, Colditz IG, Andrew M, Gill HS, Altmann KG (1994).** Age-dependent immune response in Merino sheep. *Res Vet Sci*, 57 (2) 152-158.
- Zvinorova PI, Halimani TE, Muchadeyi FC, Matika O, Riggio V, Dzama K (2016).** Prevalence and risk factors of gastrointestinal parasitic infections in goats in low-input low-output farming systems in Zimbabwe. *Small Rumin Res*, 143, 75-83.



## Zoonotic Importance of *Giardia* spp. Infections in Asymptomatic Dogs

Bengü BİLGİÇ<sup>1</sup> Alper BAYRAKAL<sup>1</sup> Banu DOKUZEYLÜL<sup>1</sup> Tamer DODURKA<sup>2</sup>

Mehmet Erman OR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, İstanbul, Turkey

<sup>2</sup> İstanbul Rumeli University, Faculty of Art and Design, Department of Gastronomy and Culinary Arts, İstanbul, Turkey

Received: 03.11.2020

Accepted: 16.11.2020

### ABSTRACT

*Giardia intestinalis* (*G. lamblia*, *G. duodenalis*) is a common protozoan in human and other mammals worldwide causing diarrhea, vomiting, abdominal pain, weight loss and dehydration. The major infection occurs via directly faecal-oral route or indirectly contaminated food and water consumption. Dogs can carry the zoonotic genotypes of *Giardia* without any clinical signs and contaminate the environment. Asymptomatic carrier dogs living in the same environment with humans, food and water contaminated with these dogs' faeces can be a source of infection for humans. The aim of this review is to emphasize the asymptomatic course of *Giardia* spp. infections in dogs and to evaluate the effects of asymptomatic carriage on human health and the environment.

**Keywords:** *Giardia*, Dog, Zoonotic Diseases

### ÖZ

## Asemptomatik Köpeklerde *Giardia* spp. Enfeksiyonlarının Zoonotik Önemi

*Giardia intestinalis* (*G. lamblia*, *G. duodenalis*) tüm dünyada yaygın olarak görülen, insanlarda ve diğer memelilerde ishal, kusma, kilo kaybı, abdominal ağrı ve dehidrasyona neden olan bir protozoondur. Başlıca bulaşma direkt olarak feko-oral yolla veya indirekt olarak kontamine gıda ve su tüketimi ile gerçekleşir. *Giardia duodenalis* köpeklerde asemptomatik seyredabilmektedir. Köpekler *Giardia* spp.'nin zoonotik genotiplerini herhangi bir klinik belirti göstermeksizin taşıyıp çevreye saçabilmektedir. İnsanlarla aynı ortamda yaşayan asemptomatik taşıyıcı köpekler ve bu köpeklerin dışkıyla kontamine gıda ve su, insanlar için enfeksiyon kaynağı olabilmektedir. Bu derlemenin amacı köpeklerde görülen *Giardia* spp. enfeksiyonlarının asemptomatik seyirinin vurgulanması ve asemptomatik taşıyıcılığın insan sağlığı ve çevre üzerine etkilerinin değerlendirilmesidir.

**Anahtar Kelimeler:** *Giardia*, Köpek, Zoonotik Hastalıklar

### INTRODUCTION

*Giardia intestinalis* (*G. lamblia*, *G. duodenalis*) is a common intestinal protozoan of humans and other mammals (Thompson et al. 2001; Lebbad et al. 2011). It is one of the the parasitic causes associated with diarrhea commonly seen in humans (Lebbad et al. 2011). Especially due to its effects on children and public health in developing countries, it's been included in the "Neglected Diseases" list of the World Health Organization (Savioli et al. 2006). The prevalence of *Giardia* is 10% in well-cared dogs, 36-50% in puppies, and up to 100% in shelter dogs (Hahn et al. 1988; Barutzki et al. 2007; Ballweber et al. 2010). *Giardia* infections are most common in the environments where its cysts and environmental contamination are high, such as breeding facilities, shelters, dog parks, pet shops, and free-range dog communities (Thompson et al. 2012).

The clinical presentation may be acute, chronic or asymptomatic. Clinical symptoms are generally including diarrhea, vomiting, weight loss, abdominal pain, and dehydration. The host's immune system, age, nutritional status, genotype of the agent, the dose of the infection and possible co-infections can also play a role in the development of the disease (Ryan et al. 2013; Halliez et al. 2013; Olson et al. 2010).

### Host Specification and Genetic Groupings

*Giardia* has a wide host range (Thompson et al. 2004; Ryan et al. 2013). Currently, eight genetic groups (assemblages) associated with *G. duodenalis* have been identified. Two of these groups (groups A and B) are found in both humans and animals, while the remaining six (group C-H) are host-specific and do not infect humans. Some different genotypic groups are similarly specific to specific animal hosts. Host specificity of the parasite is important not only



in grouping the agent but also in understanding the zoonotic feature of the agent (Ryan et al. 2013).

*Giardia* cysts are highly resistant to environmental conditions provides an advantage in the transmission of the parasite directly from the infected animal to another or indirectly through environmental and food contamination (Thompson et al. 2004). The transmission of the disease occurs mainly by consumption of contaminated food and water or by the faecal-oral route. Cysts that are excreted in feces can live in the environment for months, contaminating food and water. The most important *Giardia* outbreaks in humans are associated with drinking water consumption contaminated with infected human and pet faeces (Thompson et al. 2004; Aydın et al. 2004; Thompson et al. 2000; Van et al. 2002; Stein et al. 2000). People living in the same environment with pet animals may take the parasite from asymptomatic carrier dogs by the faecal-oral route when hygiene conditions are not sufficient (Traub et al. 2004).

### Zoonotic Potential of Asymptomatic Dogs

Although *Giardia* is fairly common in dogs, clinical manifestation of the disease is rarely seen (Bouزيد et al. 2015). Cases in which clinical giardiasis has been reported are generally associated with stressful environments such as shelters (Thompson et al. 2004; Robertson et al. 2000). According to a study in Australia (Palmer et al. 2008) *Giardia* was reported as the most common parasite in healthy dogs. The parasite is commonly found in asymptomatic dog feces as well as in symptomatic dogs in developed and developing countries (Yason et al. 2007; Ryan et al. 2013; Duncan et al. 2020; Sokolow et al. 2005). Nevertheless, it may lead to intestinal pathologies causing chronic malabsorption without clinical symptoms in asymptomatic infected animals. These can be listed as villous atrophy, diffuse shortening of microvilli, decrease in disaccharidase activity, loss of epithelial barrier function, increased permeability and enterocyte apoptosis (Palmer et al. 2008; Anderson et al. 2004). Molecular data clearly shows that dogs host the zoonotic genotypes of *G. duodenalis* (Thompson et al. 2001). Therefore, asymptomatic carriers of *Giardia* may act as reservoirs and create potential sources of infection for humans and other animals (Anderson et al. 2004). There are many studies suggesting the zoonotic potential of *Giardia* between humans and dogs (Rimhanen-Finne et al. 2007; Huber et al. 2005; Anderson et al. 2004; Meireles et al. 2008; Jacobs et al. 2001; Naser et al. 2017). In subclinical infections, asymptomatic carrier animals shed *Giardia* cysts in their feces for a long time and cause environmental contamination (Uchôa et al. 2017). In a study about the prevalence of *G. duodenalis* in Spain (Dado et al. 2012), zoonotic A and B groups were isolated from the stool samples of dogs. As a result of the study, it was stated that these animals have a high zoonotic potential and pose a public health risk.

Discussions and researches on *Giardia's* zoonotic role have continued since the World Health Organization (WHO) recognized Giardiasis as a zoonotic disease. Recent developments in biology, genetics and taxonomy isolates of *Giardia* obtained from different hosts and molecular similarities of these isolates in different hosts clearly reflect the zoonotic potential of the disease. Giardiasis poses a health risk for both humans and animals in terms of its high prevalence and its ability to infect (Feng et al. 2011; Caccio et al. 2015). Faeces play an important role in the transmission of the disease, it should be kept in mind that carrier dogs can be a source of infection for people

who share the same environment with dogs even if the dog does not show any symptoms.

The fact that water resources are one of the most important factors that play a role in the spread of *Giardia* suggests that it may also cause infections in aquatic life and have negative effects on ecosystem health (Fayer et al. 2004). It is important for environmental health to control the water contaminated with the feces of domestic animals. In our opinion, it may be important to ensure the control of environmental water resources used in human and animal consumption due to the fact that it contains *Giardia* groups that have zoonotic potential as a result of the contamination of water resources in our country (Anderson et al. 2004).

*Giardia* infections are more common in young animals, dogs living in-doors, crowded environments and shelters (Jacobs et al. 2001). Because asymptomatic infected dogs can be a source of infection for other animals and the zoonotic potential of the parasite, dogs that are kept at home and housed in crowded environments should be checked for *Giardia* regularly and appropriate treatment should be applied if necessary. Some studies suggest the necessity of treatment in asymptomatic dogs (Thompson et al. 2001; Palmer et al. 2008). A single test method is not always sufficient for fecal analysis used in the diagnosis of *Giardia* in dogs and intermittent scattering of the organism can cause false negative results. Therefore, when considered in terms of public health, more advanced diagnostic methods and more effective treatment and prevention strategies are needed in patients with asymptomatic giardiasis. Although cases have been reported that the vaccine applications developed for *Giardia* reduce fecal cyst shedding and are effective in elimination of the disease (Olson et al. 2001; Olson et al. 2000), it is stated that the effectiveness of the vaccine is controversial in asymptomatic cases (Anderson et al. 2004).

In conclusion, *Giardia* infections in dogs can be asymptomatic. Zoonotic *Giardia* groups can cause fecal contamination from the carrier dog in the environment. Fecal cysts may infect humans directly or indirectly through the faecal-oral route. Because of the zoonotic potential of the disease, dogs living in the same environment with humans need regular veterinary control and *Giardia* testing to provide treatment and prophylaxis. Waterborne contamination is the most important risk factor, drinking water sources used for consumption of both human, pet and livestock should be regularly checked for *Giardia* contamination. In our opinion, developing and using effective and routine vaccination practices of *Giardia* in dogs in our country will be beneficial in reducing the prevalence of asymptomatic *Giardia*.

---

### CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

---

### REFERENCES

- Anderson KA, Brooks AS, Morrison AL et al. (2004). Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. *Can Vet J*, 45, 924-930.
- Aydın AF, Besirbellioğlu BA, Avci İY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. (2004). Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 50, 147-51.
- Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA. (2010). Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol*, 26, 180-189.

- Barutzki D, Thompson RC, Wielinga C, Parka U, Schaper R. (2007).** Observations on *Giardia* infection in dogs from veterinary clinics in Germany. *Parasitol Res*, 101, 153-6.
- Bouziid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR. (2015).** The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet Parasitol*, 207, 181-202.
- Caccio SM. (2015).** Giardiasis: a zoonotic infection or not? Zoonoses-infections affecting humans and animals. In: Sing A (Ed.), 821-848, Springer, New-York.
- Dado D, Montoya A, Blanco MA, et al. (2012).** Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitol Res*, 111, 2419-2422.
- Duncan KT, Koons NR, Litherland MA, Little SE, Nagamori Y. (2020).** Prevalence of intestinal parasites in fecal samples and estimation of parasite contamination from dog parks in central Oklahoma. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 19, 100362.
- Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS. (2004).** Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol*, 20, 531-536
- Feng Y, Xiao L. (2011).** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 24(1), 110-40.
- Hahn NE, Glaser CA, Hird DW, Hirsch DC. (1988).** Prevalence of *Giardia* in the feces of pups. *J Am Vet Med Assoc*, 15, 192(10), 1428-9.
- Halliez MC, Buret AG. (2013).** Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*, 19, 8974-85.
- Huber F, Bomfim TCB, Gomes RS. (2005).** Comparison between natural infections by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Vet Parasitol*, 130, 69-72.
- Jacobs SR, Forrester CPR, Yang J. (2001).** A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Can Vet J*, 2001, 42, 45-46.
- Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, et al. (2011).** Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(8), e1262.
- Meireles P, Montiani-Ferreira F, Thomaz-Soccol V. (2008).** Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Vet Parasitol*, 152, 242-248.
- Naser A, Wadood IA. (2017).** Detection of *Giardia* infection in dogs of Basrah city. *Bas J Vet Res*, 16(2), 159-171.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW. (2000).** *Giardia* vaccination. *Parasitol Today*, 16, 213-7.
- Olson ME, Hannigan CJ, Gaviller PF, Fulton LA. (2001).** The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs. *Can Vet J*, 42, 865-8.
- Olson ME, Leonard NJ, Strout J. (2010).** Prevalence and diagnosis of *Giardia* infection in dogs and cats using a fecal antigen test and fecal smear. *Can Vet J*, 51(6), 640-642.
- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RCA. (2008).** Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol*, 14, 154(1-2), 142-7.
- Rimhanen-Finne R, Enemark HL, Kolehmainen J, Toropainen P, Hänninen ML. (2007).** Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 145, 345-348.
- Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. (2000).** The role of companion animals in the emergence of parasitic disease. *Int J Parasitol*, 30, 1369-1377
- Ryan U, Cacciò SM. (2013).** Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol*, 43(12-13), 943-56.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. (2006).** *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*, 22(5), 203-8.
- Sokolow SH, Rand C, Marks SL, Drazenovich NL, Kather EJ, Foley JE. (2005).** Epidemiologic evaluation of diarrhea in dogs in an animal shelter. *Am J Vet Res*, 66(6), 1018-24.
- Stein PL. (2000).** The great Sydney water crisis of 1998. *Water Air Soil Poll*, 123(1-4), 419-436.
- Thompson RC, Monis P. (2012).** *Giardia*-from genome to proteome. *Adv Parasitol*, 78, 57-95.
- Thompson RCA. (2000).** Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*, 30, 1259-1267.
- Thompson RCA. (2004).** The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*, 126, 15-35.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RCA. (2004).** Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128(Pt 3), 253-262.
- Uchôa FFM, Sudré AP, Macieira DB, Almosny NRP. (2017).** The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs and cats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 24, 59, e61.
- Van Keulen H, Macechko PT, Wade S, Schaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. (2002).** Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol*, 108(2), 97-107.
- Yason JA, Rivera WL. (2007).** Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol Res*, 101(3), 681-7.



## A Case of Duodenal and Pancreatic Agenesis in A Calf

Ayhan ATASEVER<sup>ID</sup> Görkem EKEBAŞ<sup>ID</sup>

*Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Patology, Kayseri, Turkey*

Received: 20.04.2020

Accepted: 04.08.2020

### ABSTRACT

A three-day-old Montafon calf was brought to the clinic and died in spite of intervention attempts. In the necropsy of this calf, abdominal cavity was filled with caseous material and intestines were distended due to gas accumulation, had an anemic texture. The liver tissue was pale gray-white in color. The duodenum was not present where it should normally be between the jejunum and the pyloric region of the abomasum. Instead, there was a structure presenting hyperemic and adipose tissue about 25-30 cm, along with lymph nodules. At the end of the Pylorus and at the beginning of the jejunum, there were luminal structures near the thick, crumpled crater-like circle. The pancreas was not present where it anatomically should be found. In the chest cavity, the lungs were congestion and not fully collapsed. The heart muscle was pale. In the lights of necropsy and histopathological findings, case was diagnosed as congenital duodenal agenesis, according to the authors knowledge this is the first report in a calf in Turkey.

**Keywords:** *Duodenal Agenesis, Calf, Congenital, Pancreas, Intestine*

### ÖZ

### Bir Buzağıda Duodenum ve Pankreatik Agenesis Olgusu

Agoni halinde kliniğe getirilen 3 günlük Montafon buzağının yapılan müdahaleye rağmen öldü. Bu buzağıya yapılan nekropside barsakların anemik ve gazla dolu olduğu, karın boşluğunda kazeöz yapılar görüldü. Karaciğer dokusu soluk gri-beyaz renkte idi. Duodenum normalde jejunum ve abomasumun pilorik bölgesi arasında olması gereken yerde mevcut değildi. Bunun yerine, lenf nodülleri ile birlikte yaklaşık 25-30 cm'lik hiperemik ve yağ dokusu sunan bir yapı vardı. Pylorus'un sonunda ve jejunumun başında, kalın, buruşuk krater benzeri dairenin yakınında lüminal yapılar vardı. Pankreas anatomik olarak bulunması gereken yerde yoktu. Göğüs boşluğunda akciğerler konjensyonlu ve kollabe olmadığı gözlemlendi. Kalp kası soluk renkte idi. Buzağılarda ender görülen, nekropsis bulguları ve histopatolojik incelemeler sonucunda konjenital duodenal agenezis olarak tanımlanan bu olgu Türkiye'den bildirilen ilk vakadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Bağırsak, Buzağı, Duodenum Agenesisi, Konjenital, Pankreas*

### INTRODUCTION

Numerous cases of congenital malformations involving various parts of the intestines have been reported in domestic animals (Priour and Dargatz 1984). The cause of defects in the intestines of animals is ischemia, which usually occurs in a segment of the intestine in the early stages of fetal life (Azizi et al. 2010; Jubb et al. 1993). Intestinal atresia is the most common in domestic animals and the most common intestinal anomalies in ruminants are atresia coli, atresia ani, atresia recti (Demiraslan et al. 2014; Göksel and Saritaş 2015; Jubb et al. 1993).

It has been reported that atresia ani is inherited in cattle, atresia jejuni is an autosomal disease in Highland cattle and Jersey breeds, but atresia coli is not genetically understood (Priour and Dargatz 1984) and segmental intestinal agenesis is rarely reported (Priour and Dargatz 1984). The submitted duodenal agenesis case is thought

have a worth of publication since the number of literatures on it is very limited both in world and our country.

### CASE HISTORY

The 3-day-old male Montafon calf was brought to the clinic in poor general condition and in agony. Clinical history, taken from the owner, anorexia, weakness and inability to defecate. Clinical examination revealed that the in the lymph nodes growth, dehydrated, difficulty breathing and tympanic abdominal was presented. The hemoglobin values were low and leukocyte, lymphocyte and monocyte cells were high, suggesting a septic infection, but the died without detailed intervention.

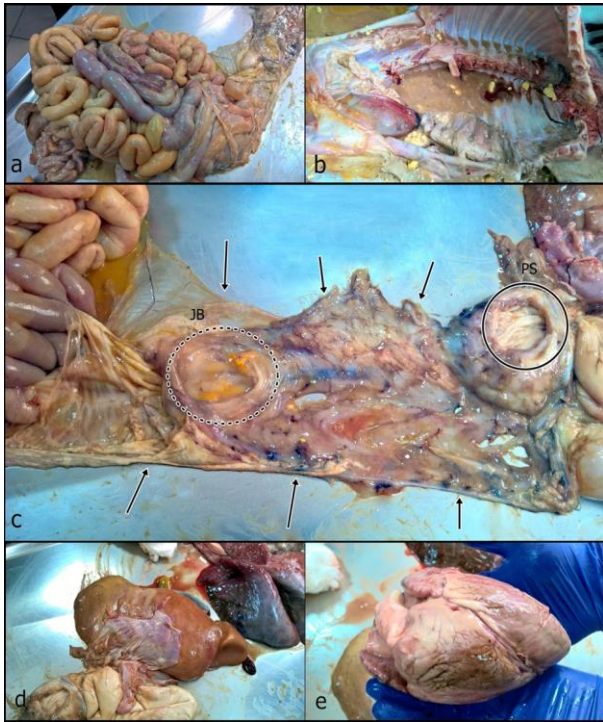
When the abdominal cavity was opened, the intestines was gas filled (Figure 1a). It was observed that the contents of the stomach containing the cheesy milk clots were in the abdominal cavity (Figure 1b). At the end of the abomasal





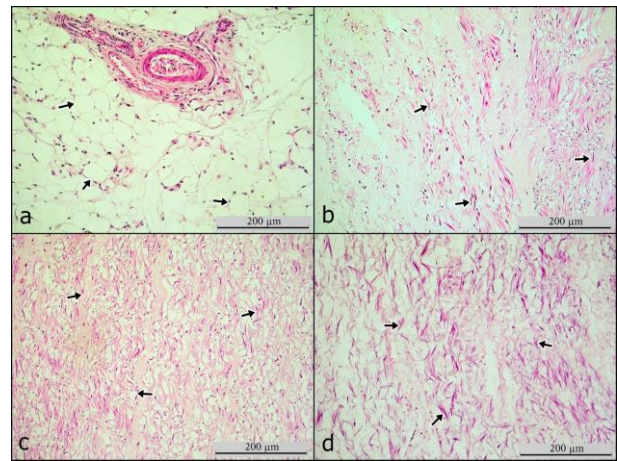
pylorus region (PS), there was no duodenum, which should be between the jejunum (JB), and a 25-30 cm membrane structure consisting of hyperemic and adipose tissue and lymphoid nodules was observed (Figure 1c). It was seen that pylorus reached abomasum from this structure while it was connected to small intestines by luminal opening by jejunum (Figure 1c).

In addition, the pancreas was not present where it anatomically should be found. The liver was pale gray-white color (Figure 1d). Pelvic of the urinary bladder is grown inside was full of urine. When the chest cavity was opened, it was observed that the lungs were reddish and not well collapsed. The heart was anemic and the muscles were pale (Figure 1e).

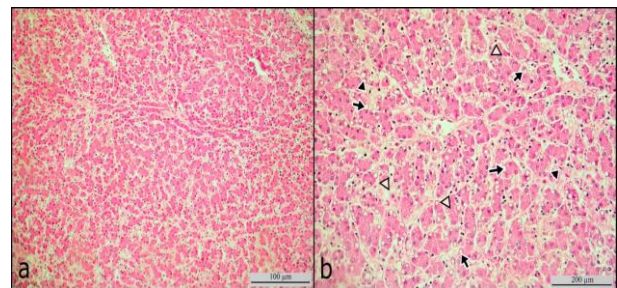


**Figure 1.** a. Gas-filled intestine appearance. b. Appearance of stomach contents, including cheeses, in the abdomen-chest cavity. c. The appearance of the duodenum and pancreas instead of the membranous at the end of the abomasal pylorus (PS) region and between the jejunum (JB). d. Appearance of liver in gray-yellowish color. e. Appearance of heart muscle was pale.

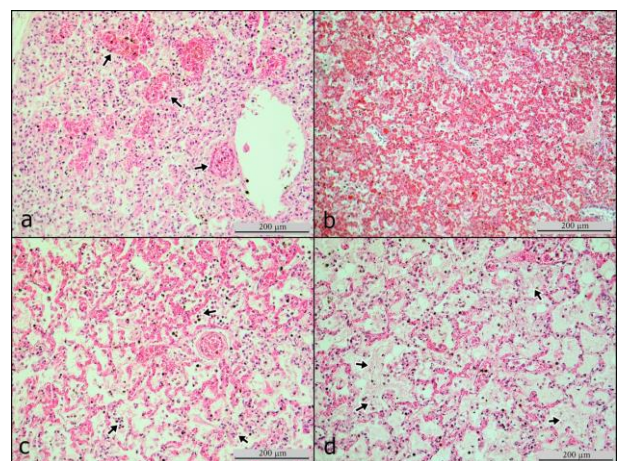
In the sections prepared with membranous tissue, hyperemic blood vessels, fatty tissues composed of fat cells in large areas, collagen and fibrous tissue cells (fibrocytes-fibroblasts) and structures composed of myocytes were observed (Figure 2 a,b,c,d). Hepatocyte cytoplasm was found to have sharp-edged rounded vacuole formation in the liver (Figure 3a). While lymphocytic cells were seen in the sinusoids, an increase in the number of Kupffer cells was detected (Figure 3b). Hyperemic blood vessels (Figure 4a) and severe congestion (Figure 4b) were noted in the lungs. Additionally, in some areas, the alveolar epithelium detached into the exudative mass (Figure 4c) admixed with fibrin (Figure 4d).



**Figure 2.** a. Fatty appearance of fat cells forming large areas composed of fat cells, Membranous Mass (arrows), HxE, x20. b-c. The appearance of collagen and fibrous tissue cells (fibrositis-fibroblasts), Membranous Mass, (arrows) HxE x20. d. Appearance of Myocytes Membranous Mass, (arrows) HxE, x20.



**Figure 3.** a. The appearance of rounded fat vacuoles of different sharp edges with multiple sizes in the cytoplasm of hepatocytes scattering diffusely in the parenchyma Liver, HxE, x10. b. Numerous increase in number of lymphocytic serial cells (white arrows), fat vacuoles (arrows) and Kupffer cells (arrow heads) in the sinusoids, Liver, HxE, x20.



**Figure 4.** a. Hyperemic blood vessels (arrows), Lung HxE, x20. b. Hyperemia and severe congestion in interalveolar vessels in the form of large areas, Lung HxE, x20. c. Appearance of spilled alveolar epithelium in the exudative mass of the alveolar lumen (arrows), Lung HxE, x20. d. Appearance of fibrin in the alveolar lumens (arrows), Lung HxE, x20.

## DISCUSSION

Congenital malformations involving parts of the intestines in domestic animals have been reported alone or in combination with other system malformations (Prieur and Dargatz 1984). The cause of malformation and defective occurrences in intestines is ischemia, which usually occurs in a segment of the intestine in the early stages of fetal life (Azizi et al. 2010; Jubb et al. 1993). The most known and most studied are atresia which appears as partial or complete intestine obstruction. Most of them are known as the determined by inherited autosomal recessive genes (Prieur and Dargatz 1984). It is known that the etiologies of segmental intestinal agenesis cases are similar (Prieur and Dargatz 1984), while others are originated from viral infection causing multiple malformations of the nervous-skeletal-muscular system (Elbers et al. 2012; Jubb et al. 1993; Smolec et al. 2010).

Prieur and Dargatz (1984) reported segmental intestinal agenesis in a 2-day calf and reported that there was no ileocecal region and colon, but fat and mesenteric lymph nodules were present in the rectum and anus (Prieur and Dargatz 1984). However, intestinal agenesis is similar to our case but the anatomical region and multiple anomalies are different.

Pancreatic congenital agenesis in human medicine is rarely reported as the absence of the dorsal part of the pancreas (Gold 1993; Schnedl et al. 2009). Among the anomalies seen is the division of the pancreas followed by the ectopic pancreas (Schnedl et al. 2009). In the agenesis of the dorsal pancreas, the ventral part is accompanied by hypertrophy (Gold 1993). No reported cases of congenital agenesis of the pancreas were encountered in veterinary medicine.

Gastro-intestinal perforations in humans and animals are usually caused by gastric dilatation and volvulus, obstruction, blunt abdominal and piercing abdominal trauma, and intestinal changes (Boysen et al. 2003; Hinton et al. 2002). Acute obstruction in the intestines is mostly found in duodenum and jejunum, while chronic obstruction is found in the ileum in the large intestine (Jubb et al. 1993). Intestinal perforation can be caused by an extrinsic obstruction such as external ileus (Blikslager et al., 1992), abscess, peritonitis, as well as occlusion of intestinal lumen mechanically by foreign body (Hayes 2009), parasite (Beyazit and Selver 2011), enterolith, phytobezoar and trichobezoar (Barrs et al. 1999). There are cases of gastro-intestinal perforation reported in zebra (Beyazit and Selver 2011), horse (Hawkins et al. 1993), cats and dogs (Boysen et al. 2003; Hinton et al. 2002). Gastro-intestinal perforation is a common cause of septic peritonitis and is a condition that should be urgently intervened (Boysen et al. 2003; Hayes 2009; Hinton et al. 2002). In our case; Similar to gastro-intestinal perforations observed in humans and animals, it is septic peritonitis that can only occur when the stomach intestinal contents are poured into the abdominal cavity and the animal can live for several days. The separated points were not a perforation of the disease but duodenal agenesis.

While gastro-intestinal perforation may differ clinically from perforation, it often appears as fatigue, loss of appetite, vomiting, and food intake. The signs and symptoms of mucous membranes are jaundice, difficulty in breathing, abdominal pain, decrease in albumin level, white cell number and variability in liver enzymes and

thrombocytopenia (Boysen et al. 2003; Braun 2016; Van Metre et al. 2005). Hypochloremia, hyponatremia, hypokalemia and hyperglycemia are frequently seen in serum biochemistry in cases of gastro-intestinal perforation (Van Metre et al. 2005). In the blood examination, low hemoglobin values and high leukocyte, lymphocyte and monocyte cells initially suggested that it was a septic infection. However, necropsy has also been shown to have duodenal agenesis and not associated with infection.

As a result; If there are complaints, anorexia, weakness, vomiting and defecation in the calves for a few days, it is necessary to consider intestinal atresia, intestinal perforations as well as partial agenesis in the intestines, which are more important than these. In addition, abdominal radiography should be used, and if the animal is dead, it is concluded that determining the cause of clinical findings by performing necropsy will be enlightening for later cases

## CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Azizi S, Mohammadi R, Mohammadpour I (2010). Surgical repair and management of congenital intestinal atresia in 68 calves. *Vet Surg*, 39, 115-120.
- Barrs VR, Beatty JA, Tisdall PLC et al. (1999). Intestinal obstruction by trichobezoars in five cats. *J Feline Med Surg*, 1, 199-207.
- Beyazit A, Selver MM (2011). İzmir'de Bir Zebrada Görülen Parazitler. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 35, 204-206.
- Blikslager AT, Bowman KF, Haven ML, Tate JL, Bristol DG (1992). Pedunculated lipomas as a cause of intestinal obstruction in horses: 17 cases (1983-1990). *J Am Vet Med Ass*, 201, 1249-1252.
- Boysen SR, Tidwell AS, Penninck DG (2003). Ultrasonographic findings in dogs and cats with gastrointestinal perforation. *Vet Radiol Ultrasound*, 44, 556-564.
- Braun U (2016). Ascites in Cattle: Ultrasonographic Findings and Diagnosis. *Vet Clin N Am-Food A*, 32, 55-83.
- Demiraslan Y, Aslan K, Gurbuz I, Ozen H (2014). Simental Bir Buzağıda Görülen Çoklu Konjenital Anomaliler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20, 629-632.
- Elbers AR, Loeffen WL, Quak S et al. (2012). Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011-2012. *Emerg Infect Dis*, 18, 1065-1071.
- Göksel BA, Saritaş ZK (2015). Buzağılarda İntestinal Atresia'larda Klinik ve Operatif Yaklaşımlar. *Kocatepe Vet Derg*, 9, 200-210.
- Gold RP (1993). Agenesis and pseudo-agenesis of the dorsal pancreas. *Abdom Imaging*, 18, 141-144.
- Hawkins JF, Bowman KF, Roberts MC, Cowen P (1993). Peritonitis in horses: 67 cases (1985-1990). *J Am Vet Med Ass*, 203, 284-288.
- Hayes G (2009). Gastrointestinal foreign bodies in dogs and cats: a retrospective study of 208 cases. *J Small Anim Pract*, 50, 576-583.
- Hinton LE, Mcloughlin MA, Johnson SE, Weisbrode SE (2002). Spontaneous gastroduodenal perforation in 16 dogs and seven cats (1982-1999). *J Am Anim Hosp Assoc*, 38, 176-187.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1993). The alimentary system. In: Pathology of Domestic Animals, 1-318, Academic Press, San Diego.
- Prieur DJ, Dargatz DA (1984). Multiple visceral congenital anomalies in a calf. *Vet Path*, 21, 452-454.
- Schnedl WJ, Piswanger-Soelkner C, Wallner SJ et al. (2009). Agenesis of the dorsal pancreas and associated diseases. *Digest Dis Sci*, 54, 481-487.
- Smolec O, Kos J, Vnuok D, Stejskal M, Bottegaro NB, Zobel R (2010). Multiple congenital malformation in a Simental female calf: a case report. *Vet Med-Czech*, 55, 194-198.
- Van Metre DC, Callan RJ, Holt TN, Garry FB (2005). Abdominal emergencies in cattle. *Vet Clin Food Anim Pract*, 21, 655-696.



# VAN VETERINARY JOURNAL



## Article Copyright Transfer Agreement Form

We, the undersigned researchers, certify that; the article we have sent; is original, wasn't sent to or disapproved of potential publication by any other journal, wasn't initially published, and we bear the responsibility concerning the Scientific content and Ethical values related to the article, and transfer any kind and form of copyright related to the Article to Van Veterinary Journal since it is published in the journal, and accept that we will not make any changes wholly or partly in the article and chose ..... as the authorized researcher.

**Title of the article:**

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

Authors Name	Date	Signature
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		

### Authorized Researcher

Title, Name-Surname : .....

Full Address : .....

e- mail : .....

Tel, Fax : .....

Date and Signature : .....



### Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is **Van Vet J.**
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication. Article plagiarism report: Before submitting an article to our journal, the similarity of the article should be determined and uploaded to the system with appropriate plagiarism software programs (iThenticate, Turnitin etc.). The overall similarity rate is expected to be below 10%, but up to a 15% similarity rate is allowed by the Editorial Board, depending on the nature of the study. Articles that are over this determined rate are returned to the author..
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://dergipark.gov.tr/vanvetj> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures, graphs and references; original article should not exceed 15 pages, short paper and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 250 words. Abstract should include **Aim, Material and Methods, Results** and **Suggestion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system. In addition, if there is a requirement and necessity for "Ethics Committee Approval" in scientific studies sent to our journal, explanatory information including the name, number and date of the ethics committee from which the ethics committee approval /

permit document was obtained should be clearly stated in the material and method section.

**9-** Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.

**10- Copyright Transfer Agreement Form** should be signed by all authors and submitted electronically by uploading manuscript.

**11-** Apart from tables all visual elements (Graphics, photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **Figure**. Tables and graphs are named as it is.

**12-** Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish** and **English** in the text. It should be numbered according to the order of use, expressed in short titles, and should be cited by giving the table number in the text. Table titles should be written in the writing language of the article in the upper part of the table. Abbreviations used in the table and necessary explanations should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

**13- Cover file** should be created and uploaded to the system. **Title Page: Turkish and English titles, author names, institutional information (English and Turkish), projects, congresses, ethics, etc. information should be provided.** [Click here for Sample Title Page.](#)

**14- Original Article:**

**Main Text File: Title. Short Title. Abstract and Keywords, English title, Introduction with Abstract and Keywords, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgment or Information (if any), References. Each Table and Figure should be on separate pages.**

**Case Reports:**

Scientific works in which the authors encounter new or rare observed cases. Maximum 15 sources should be used and attention should be paid to the possibility of current sources. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

**Short Paper:**

It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. It should contain no more than 2 tables and figures.

**15-** References should be listed according to authors surname alphabetically (APA Citation type). In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Isleyici et al. 2015). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the [Web of Science](#). For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:

## Articles:

**Isleyici O, Sancak YC, Sancak H, Yucel UM (2015).** Determination of aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. *Van Vet J*, 26 (3), 151-155.

**Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. (1985).** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England J Med*, 312 (7), 404-407. (For articles with more than 6 authors)

**Ekin IH, Gurturk K, Ilhan Z, Arabaci C, Gulaydin O (2015).** Detection of enzyme activities and their relation to serotypes of bovine and human group B streptococci. *J Med Microbiol*, 64, 985-989

## Books:

**Marrow DA (1986).** Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

## Books chapters:

**Bahk J, Marth EH (1990).** Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.

**Electronic Material:** The name of the article and available web address and access date should be written.

## Anonymus

**(1)** [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian\\_influenza/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/) Access date: 10 January 2009.

## Thesis:

**Mis L (2009).** The effect of zinc inadequate diet and the addition of zinc on lipid peroxidation and erythropoietin levels in rats with experimental renal failure. PhD thesis, Van Yüzüncü Yıl University Institute of Health Sciences, Van.

## Paper Submitted at the Scientific Meeting:

**Oğuz B (2018).** Molecular Analysis of *Echinococcus granulosus* through Amplification of COX1 Gene Fragments from Sheep in Van province. In: Proceeding of the 1st International GAP Agriculture and Livestock Congress, Sanliurfa, Turkey.

**16-** Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>). Up to 5, including one under the abstract should be given in both languages.

**17-** Article publications in this Journal is FREE.

**18-** Copyright fee will not be paid to the author(s).

**19-** Van Veterinary Journal uses double-blind review procedure, which both the reviewer and author identities are concealed from each other throughout process. Authors approve to submit their manuscript in compliance with the double-blind review policy.

Correspondence: Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

Yuzuncu Yil Universitesi, Veteriner Fakultesi, Dergi Editorlugu, 65080-Kampus/Van/  
TURKEY. e-mail: [vfd@yyu.edu.tr](mailto:vfd@yyu.edu.tr) Phone: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 432 225 11 27