

HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

*Harran University
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*



*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır
Published by Harran University Faculty of Veterinary Medicine*

HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University
Journal of The Faculty of Veterinary Medicine

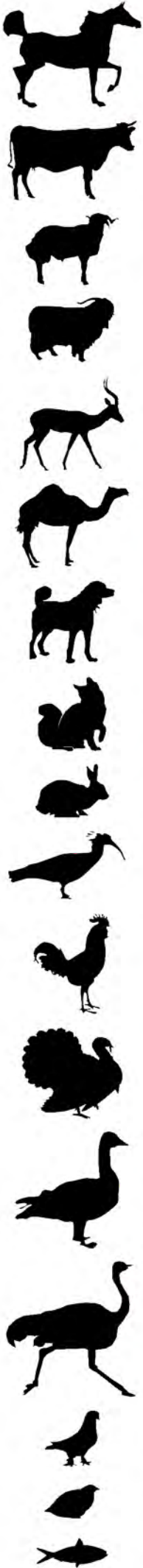


Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır
Published by Harran University Faculty Of Veterinary Medicine

YIL/YEAR:2021

CİLT/VOLUME:10

SAYI/ISSUE: 1



HARRAN ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine

Harran Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Adına
Sahibi/Owner
Prof. Dr. Nihat DENEK
Dekan/Dean

Baş Editör/Editor in Chief
Prof. Dr. Oktay KESKİN

Editörler Kurulu/Editorial board
Prof. Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI
Prof. Dr. Şükrü GÜRLER
Doç. Dr. Rahşan YILMAZ
Doç. Dr. Deniz KORKMAZ
Doç. Dr. Serap KILIÇ ALTUN
Doç. Dr. Birten EMRE

İngilizce Editörü/English Editor
Prof. Dr. Ayşe Menteş GÜRLER

Mizanpaj Editörü/Layout Editor
Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÖZGÜNLÜK

Dergi Sekreteri/Journal Secretary
Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE

Yazışma /Correspondence
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Editörlüğü Eyyübiye Kampüsü, 63200 -
Şanlıurfa/TÜRKİYE
Tel: +90 414 318 38 59
+90 414 318 38 55
Faks: +90 414 318 39 22
e-mail: harranvet@gmail.com

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Hakemli Bir Dergi Olup, Yılda 2(iki) Sayı Olarak Yayınlanır. ULAKBİM (Yaşam Bilimleri Veri Tabanı), Türkiye Atıf Dizini, Cab abstracts, Index Copernicus, Zoological Record, SOBIAD, Google Scholar gibi ulusal ve uluslararası indeksler tarafından taranmaktadır.

Yıl/Year: 2021 - Cilt/Volume: 10 Sayı/Issue 1

Danışma Kurulu/Advisory Board

Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER, Atatürk Üniv. Vet. Fak. Erzurum, Türkiye.
Prof. Dr. Halil Selçuk BİRİCİK, Aksaray Üniv. Vet. Fak. Aksaray, Türkiye
Prof. Dr. Ali BUMİN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın Türkiye.
Prof. Dr. Hasan EREN, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.
Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Anila HODA, Agric. Uni. of Tirana, Fac. of Agric.& Environ. Tirana, Albania.
Prof. Dr. Osman KUTSAL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Kayseri, Türkiye.
Prof. Dr. Manzoor Ur Rahman MIR, SKUAST Kashmir Fac. of Vet. Sci. & Anim. Husbandry. Kashmir, India.
Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.
Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Gerald REINER, Justus-Liebig Uni. Fac. of Vet. Med. Giessen, Germany.
Prof. Dr. Kazım ŞAHİN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.
Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.
Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.
Prof. Dr. Halis YERLİKAYA, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.
Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
2021 Yılı 10. Cilt 1. Sayı Hakem Listesi (alfabetik sıra)
The Referees List of This Issue (in alphabetical order)

Prof. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Duygu BAKİ ACAR	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Faruk BOZKAYA	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hakan SALCI	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Murat KİBAR	Artvin Çoruh Üniversitesi Artvin Meslek Yüksekokulu
Prof. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Oktay GENÇ	On dokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ziya İLHAN	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Emin ŞENGÜL	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. İbrahim Taci CANGÜL	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. İlknur PİR YAĞCI	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. İrem ERGİN	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Murat ŞEVİK	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Oğuz MERHAN	Kafkas Üniversitesi/Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Orhan YAVUZ	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Sena ARDIÇLI	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Serkan BAKIRCI	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Sinem Özlem ENGİNLER	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Murat SAYTEKİN	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Deniz KARAKCI	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Fırat DOĞAN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi İhsan KISADERE	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Nilgün PAKSOY	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞENGÖZ ŞİRİN	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Tuğra AKKUŞ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi

İçindekiler / Contents

Araştırma Makaleleri / Research Articles

Sayfa /Page

1. Sonradan Sahiplenilen Golden Retriever Irkı Köpeklerde Ekokardiyografik Bulgularının Değerlendirilmesi
Evaluation of Echocardiographic Findings Later Owned in Golden Retriever Breed Dogs
Mehmet İRİADAM, Melahat TOKER 1-5
2. Atlardan İzole Edilen Streptococcus equi Suşlarının Moleküler İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması
The Molecular Identification and Antibiotic Sensitivity of Streptococcus equi Strains Isolated from Horses
Osman Yaşar TEL, Abdullah Burak ÇALIŞKAN 6-11
3. Association of BRCA1 (G22231T, T25025A, C28300A) polymorphisms with subclinical mastitis and milk yields in Holstein Cattle
BRCA1 (G22231T, T25025A, C28300A) polimorfizmlerinin Holştayn Sığırlarında subklinik mastitis ve süt verimi ile ilişkisi
Fadime DALDABAN, Korhan ARSLAN, Aytaç AKÇAY, Md Mahmudul Hasan SOHEL, Bilal AKYÜZ 12-19
4. Determination of appropriate BHK-21 cell line to obtain high infective titer and 146S FMD virus particles
Yüksek İnfektif Titre ve 146S FMD Virus Partikülü Eldesi İçin Uygun BHK-21 Hücre Kültürü Hatlarının Saptanması
Veli GÜLYAZ, Ahu Kader KARA, Neslihan TAŞÇENE, Banu BAYRI ÖZBİLGE, Yasemin GÜLTEKİN, Mustafa HASÖKSÜZ, Gonca ÖZTAP 20-27
5. Kedi ve Köpeklerde Koksofemoral Eklem Çıkkıklarının Tedavisinde Modifiye Toggle Pin Tekniğinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi
Retrospective Evaluation of Modified Toggle Pin Technique in the Treatment of Coxofemoral Joint Luxations in Cats and Dogs
Ziya YURTAL, Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ, Muhammed Enes ALTUG, İbrahim ALAKUŞ, Halil ALAKUŞ, Cafer Tayer İŞLER 28-35
6. The Effect of Turkish Coffee on Performance, Biochemical, and Physiological Parameters in Rabbits
Türk Kahvesinin Tavşanlarda Performans, Biyokimyasal ve Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkisi
Mustafa MAKAV, Mükremin ÖLMEZ, Hüseyin Avni EROĞLU, Tarkan ŞAHİN 36-42
7. Immunohistochemical expressions of S100, Vimentin, PCNA, p53 and MMP-9 in bovine melanomas
Sığır melanomlarında S100, Vimentin, PCNA, p53 ve MMP-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi
Emin KARAKURT, Uğur AYDIN, Enver BEYTUT, Engin KILIÇ, Serpil DAĞ, Hilmi NUHOĞLU, Uğur YILDIZ, Ayfer YILDIZ, Emre KURTBAŞ 43-49
8. Alfa-proteobacteria Grubuna Ait Bazı Bakteri Cinslerinden İzole Edilen Antijenlerin Brusellozisin Serolojik Tanısında Potansiyel Uygulanabilirliğinin Araştırılması
Evaluation of Usage Serological Cross-Reactivities Between Brucella and Some Bacterial Genera of Alpha-Proteobacteria in Serologic Diagnosis of Brucellosis
Ahmet Selman MIZRAKLIDAĞ, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK 50-55

9. Investigation the Existence of European Foulbrood Disease in Larvae and Adult Honeybees in Some Regions of Turkey with Conventional PCR Method
Türkiye'nin Bazı Bölgelerindeki Larva ve Yetişkin Bal Arılarında Avrupa Yavru Çürüklüğü Hastalığı Varlığının Konvansiyonel PCR Yöntemi ile Araştırılması
Serdal TARHANE 56-59
10. Tiftik Keçilerinde Doğum Şeklinin Bazı Oksidatif Stres Belirteçleri ve Hormon Konsantrasyonları Üzerine Etkisi
The Effect of Delivery Mode on Some Oxidative Stress Markers and Hormone Concentrations in Angora Goats
Serdal KURT, Nebi ÇETİN, Funda EŞKİ 60-65
11. Effect of Coenzyme Q10 on Plasma Parameters In Hypothyroid Rats
Hipotiroidili Ratlarda Koenzim Q10'un Plazma Parametreleri Üzerine Etkisi
Ali Osman İNAN, Zafer DURGUN, Oğuzcan KOCA, Durmuş HATİPOĞLU 66-72
12. Bazı Vahşi Kuşlarda Trichinella spp. Larvasının Araştırılması
Investigation of Trichinella spp. Larvae in Some Wild Birds
Oya GİRİŞGİN, Ahmet Onur GİRİŞGİN, Çetin Volka AKYOL, Nurgül ÇİMENLİKAYA, Betül SAYGIN 73-76
- Olgu Sunumu/Case Report**
13. A Case of Apocrine Sweat Gland Adenocarcinoma in a Tabby Cat
Tekir Bir Kedide Apokrin Ter Bezi Adenokarsinomu Olgusu
Funda TERZİ, Elif DOĞAN, Ayşe Başak KAPÇAK 77-80
14. Chronic Uterine Infection Caused by Fetal Retention and Treatment by Unilateral Ovariohysterectomy in a Dog
Bir Köpekte Fetal Retensiyonun Neden Olduğu Kronik Uterus Enfeksiyonu ve Tek Taraflı Ovaryohistektomi ile Tedavisi
Cevdet PEKER, Eyyüp Hakan UÇAR, Güneş ERDOĞAN 81-85
- Derleme/Review**
15. Veteriner Mikrobiyolojide Hasta/Sürü Yanında Teşhis Yöntemleri
Point-of-Care Diagnostic Methods in Veterinary Microbiology
Bengi AKKOYUNLU, Barış SAREYYÜPOĞLU 86-92

Sonradan Sahiplenilen Golden Retriever Irkı Köpeklerde Ekokardiyografik Bulguların Değerlendirilmesi

Melahat TOKER^{1,a}, Mehmet İRİADAM^{2,b,*}

¹Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye
²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye
^aORCID: 0000-0001-5442-4309, ^bORCID: 0000-0002-9694-6014

Geliş Tarihi: 05.05.2020

Kabul Tarihi: 04.11.2020

Özet: Çalışmamız; 2015 ile 2020 yılları arasında Ankara ilinde özel pet kliniklerine getirilen, 6 sahihsiz golden ırkı köpek üzerinde yapıldı. Birçok safkan köpek ırkında olduğu gibi geçici bir hevesle alınan bu hayvanlar ne yazık ki bir süre sonra sokağa bırakılıyorlar. Araştırmamızda sokağa bırakılan 6 adet safkan Golden Retriever ırkı köpeğe, fiziksel muayenelerinin yanı sıra, tam kan, ultrason, röntgen, tansiyon, elektrokardiyografi ve ekokardiyografik tetkikleri uygulandı. Bunun yanı sıra bu hayvanlara aşı takvimine göre aşıları yapıldı. Sokağa bırakılan ve sonradan sahiplenilen bu hayvanların ekokardiyografileri sürekli olarak belirli aralıklarla kontrol edildi. Sonuç olarak; sokağa bırakılan Golden Retriever ırkı sahihsiz köpeklerin, daha sonra sahiplenilip en iyi koşullar da bir yaşam sağlansa bile, bu hayvanlarda sokakta geçirilen yaşamdan kaynaklı birçok kalıcı kalp bozuklukları oluşabilmektedir. Bunlara bağlı olarak da hayvanların başta solunum bozuklukları olmak üzere hem yaşam kalitesi hem de yaşamsal fonksiyonları olumsuz olarak etkilediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekokardiyografi, köpek, Ankara, Golden Retriever.

Evaluation of Echocardiographic Findings Later Owned in Golden Retriever Breed Dogs

Abstract: The study was carried out on 6 derelict Golden Retriever breed dogs brought to private clinics in Ankara province between 2015 and 2020. Unfortunately, these animals, which are taken with temporary enthusiasm, as in many pedigree dog breeds, are left on the street after a while. In the study, 6 pure breed Golden Retriever breed dogs that were left on the streets were subjected to whole blood, ultrasound, x-ray, blood pressure, electrocardiograph and echocardiography examinations in addition to their physical examinations. In addition to these animals were vaccinated on a schedule basis. Echocardiography of these animals that were left on the streets and later owned were continuously followed up at regular intervals. Consequently, even though the Golden Retriever breed of stray dogs left on the streets can be owned and lived in the best conditions, there are many disorders in their hearts permanently caused by a life spent on the streets survived in the best periods of life in the remaining periods. Accordingly, it has been determined that animals negatively affect both quality of life and vital functions, especially respiratory disorders.

Keywords: Echocardiography, dog, Ankara, Golden Retriever.

Giriş

Sahihsiz hayvan; insanlar tarafından evcilleştirilmiş ve insanın olduğu her yere insanla birlikte gelmiş, doğada gerek kendi popülasyonuna gerekse insan başta olmak üzere diğer canlı topluluklarına zarar veren kimsesiz canlılar olarak tanımlanmaktadır (Özavcı, 2012).

Maalesef insanlar, bu canlıları kendilerine bağımlı kılmakla kalmayıp, bu hayvanları sokaklara terk etmiş, sonrasında ise bazen sokaklarda bile bu canlıların varlıklarına tahammül edemez olmuşlardır (Atalay, 2004; Demir ve Uğurlu, 2014). Hemen hemen dünyanın her yerinde sahihsiz köpeklerle mücadele edildiği gibi ülkemizde de yer yer bu mücadeleye şahit olmaktayız. Bütün bu mücadelenin yanı sıra hayvan severlerin yetersiz sayıda bulunan barınakların hayvan refahı açısından optimum koşulların sağlanması adına yoğun bir çabaya ihtiyaç bulunmaktadır. Ama ne acıdır ki,

günümüzde köpeklerde olduğu gibi bazen sahihsiz hayvanların hayatta kalma çabaları gerek kendi hayatlarını gerekse insanların hayatlarını riske atacak boyutlara ulaşmıştır. Bunun nedeni; insan popülasyonu içerisinde yaşayan hayvanların sayısındaki artış ile buna bağlı olarak gıda kaynaklarının azalmasıdır. Bunun sonucunda da hayvanlar hem kaynaklara ulaşamamakta, açlıktan veya susuzluktan acı çekmekte, hem de halihazırda sınırlı olan kaynaklara ulaşırken insan sağlığını tehdit edebilmektedir (Atalay, 2004; Diez -Prieto ve ark., 2009).

Doğada serbest şekilde yaşayan sahihsiz hayvanların birçoğu yerleşim alanlarının genişletilmesi faaliyetinden olumsuz etkilenmiş su, yemek ve barınma gibi kaynaklara ulaşmaları sınırlandırılmıştır (Kılıç ve Sarierler, 2003). Bu duruma yapıcı bir düzenleme getirilmesi konusunda

herhangi bir tereddüt yoktur. Sahiplenilen köpekler hem ailelerin sosyo-psikolojisini güçlendirmekte hem de çocuklara sevgi ve paylaşmayı öğretmektedir (Begeç, 2012; Diez-Prieto ve ark., 2009).



Şekil 1. Hayvan sevgisi çocuğun kişisel gelişimine katkı sağlıyor (Demirsağlık.com.tr)

Çalışmamızda kullandığımız 6 adet Golden Terrier ırkı sahihsiz köpek, bu amaçlarla sahiplendirilen şanslı hayvanlar olup, sosyo-ekonomik olarak iyi birer ailede hayata devam etmeye başlamışlardır. Köpekler sahiplendikten sonra ilk yapılacak olan işin Veteriner Hekimin kontrolüne almak kaçınılmaz bir gerçektir (Özgür, 2012). Veteriner hekimlerin sahihsiz hayvanlar hakkında sağlıklı bir anamnez alma şansları olmadığından, fiziksel muayenenin yanı sıra, kan tetkikleri, röntgen, ultrason, EKG ve ekokardiyografi yapılarak sağlıklı ya da sağlıksız olduğuna karar verilmektedir. Sahiplenme yapıldıktan sonra köpeklerde kalp hastalıklarının tanısı, klinik, radyografik, elektrokardiyografik ve ekokardiyografik muayene yapılarak konulabilir (Douglas ve Williamson, 2009; Petric ve Tomsic, 2008). Ancak; bazı hastalıklar, radyografik olarak semptom göstermemekle birlikte, görüntünün kalitesi, hekimin bilgi ve becerisi ile teknik faktörlerin sonuçları etkileyebileceği gerçeği de göz ardı edilmemelidir. EKG sadece tamamlayıcı bir muayene yöntemi olup, değerlendirmesi de hastanın genel durumu, kan ve biyokimya değerleri ile göğüs radyografisi ve ekokardiyografi bulgular gibi yardımcı tanısal yöntemlerin sonuçları ile birlikte yapılmalıdır.

Golden Retriever büyük ırk köpek türlerinden birisi olup, sosyal, sıcakkanlı ve akıllı aile köpekleridirler. Uzun, yumuşak ve düz olan iki farklı tüy tabakasına sahip, ikinci tüy tabakası ise su geçirmemektedir. Ayrıca; hayvanların fiziksel özellikleri olarak, burun siyah, kafa biraz bombeli ve geniş, göğüs yapıları güçlü, kuyrukları düz ve uzun, kulakları ise düşük bir yapıya sahiptir. Ayrıca;

Golden Retriever ırk köpeklerde, mast hücre tümörü de dâhil olmak üzere kanser hastalıklarına yatkınlık, kalça displazisi, Von Willebrand adı verilen faktör yetersizliğine bağlı pıhtılaşma bozukluğu, kalp problemleri ve konjenital göz kusurları gibi hastalıkların sıklığı bildirilmektedir (Monnet ve ark., 1995; Ok ve ark., 2010).

Kalp hastalıkları yaşam kalitesini, yaşam süresini ve fonksiyonel kapasiteyi azalttığı için tanı ve sağaltım yönünden önem taşımaktadır. Radyografi; kalp hastalıklarının tanısında kullanılan oldukça yararlı bir yöntemdir. Kalbin büyüklüğü ve şekli hakkında direkt bilgi sağladığı gibi, kalp yetmezliğinin derecesini de ortaya koyabilmektedir (Greco ve ark., 2008). Ayrıca; kalple ilgili olmayan durumları da indirekt olarak kardiyopulmoner sirkülasyonu değerlendirmemize olanak sağlamaktadır. Kalp hastalıklarının tanısında ekokardiyografi altın standart bir tanı yöntemi olup. Muayenede; interventriküler septum kalınlığı ve anatomik yapısı, sol ve sağ atrium ventrikül duvar kalınlığı, çapları ve kontraktibilitesi belirlenebilmektedir. Mitral ve trikuspid kapakçıkların anatomik yapısı, kapakçıklar düzeyinden geçen kan akım şiddeti, aortik kapakların anatomik yapısı ve aortik stenozun yanı sıra kalbin çevresinde bulunan perikardial ve pleval sıvı değerlendirilebilir (Chetboul, 2010; Çetin ve ark., 2000). Kalp içinde ve dışında trombus, kitle, miksoma, apse, kist, yangı gibi intrakardiyak ya da ekstrakardiyak eksojenik artışlar da değerlendirilmektedir. Bunun yanı sıra kalbin anterior, posterior, lateral, septum, inferior gibi ventriküler segmenter duvarlarında hareket bozukluğu ile diastolik disfonksiyonu değerlendirilir (Çeçen, 2003; Schaer, 2003).

Materyal ve Metot

Çalışmamız, Ocak 2015 ile Mart 2020 tarihleri arasında Ankara'da özel pet kliniklerinde ekokardiyografi yapılan 6 Golden Retriever ırkı köpek üzerinde yürütüldü. Çalışmada; yaşları 5-10 arasında değişen, 3 erkek ve 3 dişi olmak üzere toplam 6 köpek kullanıldı. Golden Retriever ırkı köpekler, renk, boy ve kilo bakımından farklıklar göstermekteydi. Hastalara rutin klinik muayene ve laboratuvar incelemeleriyle birlikte elektrokardiyografi, telekardiyografi, ekokardiyografik tetkikleri uygulandı. Ekokardiyografik görüntüler Toshiba, esaote gibi Renkli Doppler ekokardiyografi cihazları ile alındı ve görüntülerin basımı için Mitsu-bishi siyah-beyaz ya da renkli printer kullanıldı.

Köpeklerin göğüs bölgesi traş edildikten sonra standart ekokardiyografi jeli kullanıldı. Hayvanlar önce sağ yanına yatırılarak sağ parasternal kısa eksen ve uzun eksen pencerelerinden muayene

edildi. Bu pencerelerde; sol ventrikül'ün M-mod ile 2-D modekokardiografik muayenesi yapıldı. Daha sonra prob kalbin basisine doğru yönlendirilerek mitral kapakların ve kranial'e yönlendirilerek pulmoner kapağın 2-D, Pulsed Wave (PW) Doppler ve renkli Doppler muayeneleri yapıldı. Bundan sonra hayvanlar sol yanına yatırılarak sol parasternal uzun eksen görüntüsünde mitral ve triküspit kapakların ekokardiografik muayeneleri yapıldı.

Amerikan ekokardiografi cemiyetinin belirlediği 17 segmenter duvar hareketi değerlendirilmektedir. İki boyutlu Ekokardiografi, Continuous-Pulsed Doppler Ekokardiografi ile yapılan ksifoid kalp penceresinden apikal 3,4 ve 5 boşluk görüntüleri alınmaktadır. Şekil 5. Apikal boşluk görüntülerinde kalp boşlukları, sistol ve diyastol çap ölçümleri, mitral, aort ve triküspit kapaklarının yapısı, yetmezliği ve darlığı değerlendirildi.



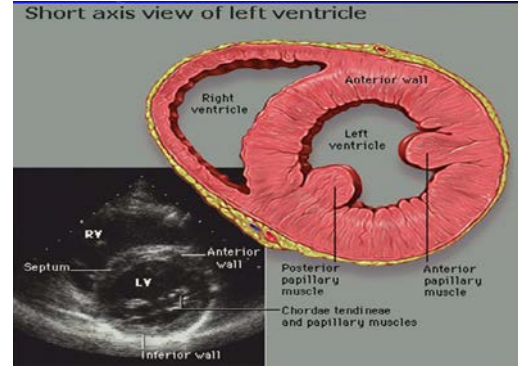
Şekil 2. Köpeklerde apikal 5 boşluk görüntüsü (sol atrium LA, sol ventrikül LV, aort AO, sağ atrium RA, sağ ventrikül RV)

Bulgular

Hayvanlardan Hachico isimli 3 yaşlı birinci erkek köpeğin ilk muayesinde oldukça bakımsız, korkak ve bitkindi. Bütün muayeneleri yapıldıktan sonra EKG ve Röntgen sonucuna göre yapılan ekokardiografide taşikardik, kalp boyutlarında sol ventrikül sistolik ve diyastolik boyutlarda artma, atrium ve sol sağ atrium çaplarında artış, kapak yetmezlikleri, ileri derece perikardial ve plevral sıvısı belirlendi. Sahiplenildikten 6 ay sonra biraz toparlamasına rağmen, kontrol ekokardiografilerinde 6-7 yaşlarında iken, ileri derece kalp krizi geçirdiği (anterior ve inferior duvarlarında hipokinetik alanlar tesbit) edildi. EF ise %35-40 arasında, mitral ve triküspit kapaklarda ise yetmezlikler belirlendi. Sürekli kontrol altında tutulan hayvanın EF%50'lere yükseldiği tespit edildi. Bütün bu sonuçlarla hayvan medikal tedavi ile takip edilmektedir.

Kayra isimli ikinci erkek köpekte ise yaklaşık 1 yaş civarında, oldukça bakımsız olup, ilk muayenesinde yapılan bütün tetkikleri ve

ekokardiografisi normaldi. Aradan geçen 5-6 yıl gibi uzun bir zaman sonra birçok patolojiler tespit edildi. Sol ventrikül konsantrik hipertrofisi, posterior duvarda hipokinezi, EF %48, pulmoner hipertansiyon 40 mmHg, mitral yetmezliği ve hafif derece de triküspit yetmezliği belirlendi.



Şekil 3. Kalbin parasternal kısa eksen kesitinde anterior, inferior ve septumun segmenter duvar hareket bozukluğu (T.C. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Radyoloji anabilim dalı anabilim dalı)

Barut isimli üçüncü erkek köpekte; 11 yaşında sokağa terk edilen, zayıf ve kliniklerimizden birisi tarafından sahiplenen hayvandı. Sahiplenildikten sonra yapılan ekokardiografisinde, sol kalp yetmezliği ve konjenital cortriatrium tespit edildi. Takip edilen ekokardiografilerinde hayvanda solunum güçlüğü ve yetmezliği belirlenmiş, ileri kalp yetmezliği ile birlikte yoğun perikardial-plevral sıvı artışı belirlendi. Hayvanda halen solunum yetmezliği devam etmektedir.

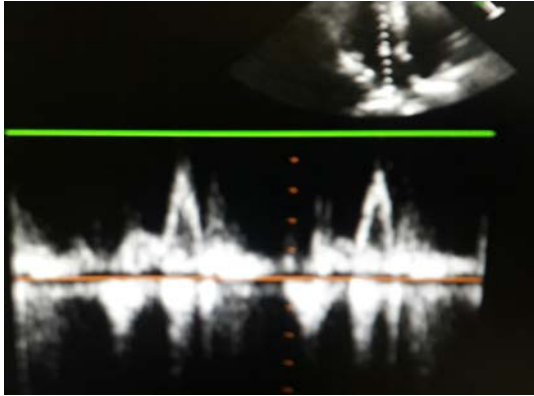


Şekil 4. Köpeğimizde ileri derece sol kalp yetmezliği.

Golden retriever ırkı köpeklerden Gece isimli 1. dişi olan kliniğe ilk getirildiğinde sakin olup, röntgende hafif derecede bir kalp büyümesi belirlendikten sonra yapılan ekokardiografisinde hafif derecede perikardial sıvı artışı ile birlikte minimal düzeyde mitral kapak yetmezliği tespit edildi. Yıllık periyodik ekokardiografik muayenelerine devam edilmektedir.

Dişi köpeklerden 2.si olan Ales'in iki boyutlu (B mode), M mode ve Renkli Doppler ekokardiyografilerin de parasternal uzun ve kısa eksen ile birlikte apikal kesitlerde çalışmaları yapıldı. Doppler ekokardiyografide diastolik disfonksiyonla birlikte mitral kapakta prolapsus tespit edildi. Mitral kapak prolapsusa bağlı olarak yetmezlik akımı izlendi. Ales yıllık yapılan rutin tetkiklerde sağlıklı bir yaşamına devam etmektedir.

Dişi köpeklerden 3. Şıla'da sokakta yaşayan, yaklaşık 6 yaşlı olup, sahiplene tarafından ilk kliniğe getirildiğinde rutin kontrollerle birlikte ekokardiyografisi de yapıldı. Kan tetkiklerinde kolesterol ve trigliserinde değişmelerin yanı sıra ekokardiyografi de sadece diastolik fonksiyon bozukluğu tespit edildi. Diastolik fonksiyon bozukluğunun nedeni olarak ta kolesterol ya/ya da trigliserit değerlerindeki artışa bağlı olabileceği şeklinde değerlendirildi. Şıla'nın yıllık periyodik ekokardiyografik muayenelerine devam edilmektedir.



Şekil 5. Köpeklerde iki boyutlu-Renkli Doppler Ekokardiyografiyle diastolik disfonksiyonu (E<A>.)

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde insanlardaki klinik uygulamalarda olduğu gibi hayvanlarda da yaygın olarak kullanılan üç ekokardiyografi yöntemi kullanılmaktadır. Bunlar; 2-D (iki boyutlu-real time) ekokardiyografi, M-mod ekokardiyografi (hareketli-çizgisel) ve Renkli Doppler ekokardiyografi teknikleridir. Genel olarak köpeklerde sağ parasternal, sol kaudal (apikal) ve sol kranial pozisyonlarda ekokardiyografik görüntüleme yapılmaktadır (Burk ve Ackerman, 1996; Chetboul, 2010). Köpeğin ön ayağının ileriye doğru alması veya yukarıya kaldırılması ve muayene edilen tarafın ters istikametine çevrilmesi, transdüserin hareketini kolaylaştıracak ve de kaburgalar arasındaki boşluğun mesafesi artırılarak kalp penceresinin daha iyi alınması açısından önem arz etmektedir. Köpeklerde yeterli görüntülerin elde edildiği sağ ve sol parasternal (sağ ve sol 3. veya 5.

interkostal aralığının alt 1/3 'i) ve ksifoid kalp penceresi olmak üzere iki standart bölge tanımlanmaktadır (Bakirel ve Bilal, 1998; Çeçen, 2003). Yaygın olarak kullanılan görüntü şekilleri; sol-sağ parasternal uzun eksen görüntüde sol-sağ ventrikül sistol ve diastol çapları, sol atrium, interventriküler septum, posterior duvar kalınlığı, aort kökü-çapı ve çıkan kısımları, ejeksiyon fraksiyon (EF%) ile fraksiyonel kısalma (FS%) değerlendirilmesi yapılırken, M mode ekokardiyografi bu seviyede kullanılmakta ve çok değerli bilgiler vermektedir. Kısa eksen görüntüleri ile ventriküler giriş ve çıkış yolları, mitral kapak seviyesinden kapak yapısına ilişkin bilgiler ve sol ventrikül segmenter bozuklukları tesbit edilmektedir (Bonagura ve Ware, 1986; Çeçen, 2003).

Çalışmamızda 6 tane sonradan sahiplenilen Golden Retriever köpeğin fiziksel muayene, bütün rutin kanları, radyolojik muayeneleri, elektrokardiyografi, tansiyon, ateş, B mode -M mode ekokardiyografi ve Doppler ekokardiyografi muayeneleri yapıldı (Darke ve Else, 1984; Demir ve Uğurlu, 2014). Hayvanların sahiplenildikten birkaç ay gibi kısa bir süre sonra canlandığı, daha cesur ve genel durumlarında iyileşmelerin görülmesine rağmen, maalesef bazı kalıtsal ve edinsel hastalıkları beraberinde taşımaktalardı. Köpeklerde ileri derece kapak yetmezlikleri, kalp krizleri, sistolik ve diastolik disfonksiyonları, yüksek tansiyon sonucunda oluşan hipertrofi, kalp çevresinde biriken perikardial ve plevral sıvılar yaşamı olumsuz olarak etkilediği bildirilmiştir (Lombard, 1984; Macdonald ve ark., 2009) Çalışmamızda kullandığımız farklı ekokardiyografi teknikleri ile incelenen bu hayvanlarda; diastolik fonksiyon bozukluğunun yanı sıra anterior ve inferior duvarlarda hipokinetik alanlar, minimal ya/ yada maksimal düzeylerde mitral ve/veya triküspit kapaklarda yetmezlikler, sol ventrikül konsantrik hipertrofi, pulmoner hipertansiyon, sol kalp yetmezliği ile birlikte konjenital cortriatrium, hafif yoğun yada şiddetli derecelerde perikardial-plevral sıvılarda artış gibi edinsel ya/ya da kalıtsal fonksiyon bozuklukları belirlendi (Çetin ve ark., 2000; Tidholm ve ark., 1997).

Bu hayvanlarda kalp ve dolaşım sistemindeki bu bozukluklar başta solunum güçlüğü ve solunum yetmezliği olmak üzere solunumsal bozukluklara, sahipsiz yaşamlarında ki düzensiz ve dengesiz beslenmelerine bağlı olarak ta kolesterol ve trigliserid gibi değerlerdeki artışların kalp ve dolaşım sisteminde olası bozukluklara yol açtığı anlaşılmış ve bu konudaki bildirimlerle uyum göstermektedir (Chetboul, 2010; Rosenthal ve Fox, 1995).

Sonuç olarak; hayvanların sokağa terk edilmesinin köpekler üzerindeki etkilerinin ne kadar

korkunç olduğunu görmemek imkansızdır. Bütün hayvanlarda olduğu gibi Golden Retriever ırkı köpeklerde de cinsiyet farkı olmaksızın, gençlik dönemlerinin sokakta geçirildiği süre içinde stres, beslenme bozuklukları, kalıtsal ve predispose faktörlerin kalıcı etkileri olduğu görülmektedir. Bu hayvanlar daha sonraki yaşamlarında sahiplenilse ve de yaşam koşulları azami ölçüde iyileştirilse bile geçmişte yaşanan sıkıntıların telafisi mümkün olamamaktadır. Geçmişte kazanılan ve bir ömür boyu sürecek olan kalp, damar ve solunum sistemine ilişkin bozukluklar her ne kadar tedavi edilirse edilsin tam olarak telafisi mümkün olamamaktadır. Tedavi ve takip edilen bu hayvanlar en iyi koşullarda yaşatılsa bile hiçbir zaman eski sağlıklarına kavuşmaları söz konusu değildir.

Bütün bu sonuçlarla; bütün sahipsiz hayvanlarda olduğu gibi Golden Retriever ırkı köpeklerin hem daha sağlıklı koşullarda yaşatılmasının yanı sıra zenginleştirilmiş kaynaklara erişimlerinin artırılması, hem de kontrolsüz üremelerinin önüne geçilerek insan sağlığının sahipsiz köpeklerin yaşayışından etkilenmemesi amaçlarını da kapsayıcı bir şekilde yapılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Teşekkür

Sokakta yaşayan hayvanlara sahip çıkıp ve onları kendi hayatlarına alıp aile bireylerine katan hayvan severlerimize teşekkür etmeyi borç biliyoruz.

Kaynaklar

- Atalay Ö, 2004: Kedi ve Köpeklerin Bazı Davranış Problemleri ve Sağaltım Seçenekleri, *Erciyes Univ Vet Fak Derg*, 1(2), 147-153.
- Bakırel U, Bilal T, 1998: İki köpekte konjestif kardiyomyopatinin ekokardiyografi ile tanısı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 4 (1-2), 83- 85.
- Begeç S, 2012: Türkiye’de Köpeklerin Savunma ve Koruma Amaçlı Kullanımı. *Uludağ Univ Vet Fak Derg*, 31 (2), 51-61.
- Bonagura JD, Ware WA, 1986: Atrial fibrillation in the dog: Clinical findings in 81 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*; 22, 111.
- Burk R.L, Ackerman N, 1996: Small Animal Radiology and Ultrasonography. 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders Company, USA.
- Chetboul V, 2010: Advanced Techniques in Echocardiography in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40 (4), 529-43.
- Çeçen G 2003: Köpeklerde Kardiyak Hastalıkların Tanısında Radyografinin Önemi. *Vet Cerrahi Derg*, 9 (3-4): 63-70.

- Çetin N, Emre B, Toker M, 2000: Perikardiyal Efüzyonlu Bir Köpekte Elektrokardiyografik ve Ekokardiyografik Bulgular. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47, 291-296.
- Darke PGG, Else RW, 1984: Canine kardiyomyopati. *Vet Annu*, 24: 237.
- Demir P, Uğurlu K, 2014: Pet Hayvan (Kedi-Köpek) Sahiplerinin Veteriner Kliniklerine İlişkin Beklentileri, *Istanbul Univ Vet Fak Derg*, 40(2), 168-175.
- Diez-Prieto I, Garcia-Rodriguez B, Ríos-Granja A, Cano-Rábano M, Peña-Penabad M, Garcia CP, 2009: Cardiac Conotruncal Malformations in a Family of Beagle Dogs. *J Small Anim Pract*, 50 (11), 597-603.
- Dukes M, Cewan J, French A,T, Corcoran B,M, 2002: Doppler Echocardiography in the Dog: measurement variability and reproducibility. *Vet Radiol Ultrasound*, 43(2), 144-52.
- Douglas SW, Williamson HD, 1970: *Veterinary Radiological Interpretation*. William Heinmann Medical Books Ltd, London.
- Greco A, Meomartino L, Rajano V, Fatone G, Brunetti A, 2008: Effect of Leftvs Right Recumbency on the Vertebral Heart Score in Normal Dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 49 (5), 454-455.
- Kılıç N, Sarierler M, 2003: Dog Bite Wounds: A Retrospective Study Cases, *YYÜ Vet Fak Derg*, 14 (2), 86-88.
- Lombard CW, 1984: Echocardiographic and clinical signs of canine dilated kardiyomyopathy. *J Small Anim Pract*; 25: 59-70.
- Macdonald KA, Cagney O, Magne ML, 2009: Echocardiographic and Clinicopathologic Characterization of Pericardial Effusion in dogs: 107 cases (1985-2006). *J AmVet Med Assoc*, 235 (12):1456-61.
- Ok M, Öztürk AS, Er C, 2010: Üç köpekte konjestif kalp yetmezliği. *Eurasian J Vet Sci*, 26 (1): 57-62.
- O’ Grady M, O’ Sullivan ML, 2004: Dilate Kardiyomyopathy: an Update. *Vet Clin Small Anim*, 34, 1187-1207.
- Özavcı V, 2012: Köpeklerde Capnocytophaga Canimorsus ve Capnocytophaga Cynodegmi Türlerinin Kültür ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması, *Doktora Tezi*, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Özgür A, 2010: Hayvanlarla Yaşamı Paylaşmak, *Vet Hek Der Derg*, 81 (2), 9-13.
- Petric AD, Tomsic K, 2008: Diagnostic Methods of Kardiyomyopathy in Dogs -Old and New Perspectives and Methods. *Slov Vet Res*, 45 (1): 5-14.
- Rosenthal SL, Fox PR, 1995: Diastolik Mitral Regurgitation Detectedby PW Doppler Echocardiography and Color Flow Doppler Mapping in 5 Dogs and 2 Cat sith 2nd Degreeand 3rd Degree Atrioventricular Block. *Vet Radiol Ult*, 36, 481-485.
- Schaer M, 2003: Clinical medicine of the dog and cat. (3rd edition), Manson Publishing, Philadelphia, USA.

*Yazışma Adresi: Mehmet İRİADAM

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Eyyübiye Yerleşkesi, Şanlıurfa-Türkiye

e-mail: miriadam@harran.edu.tr

Atlardan İzole Edilen *Streptococcus equi* Suşlarının Moleküler İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması

Abdullah Burak ÇALIŞKAN^{1,a}, Osman Yaşar TEL^{2,b,*}

¹TJK Şanlıurfa Hipodrom Müdürlüğü, ŞANLIURFA

²Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ŞANLIURFA

^aORCID: 0000-0001-5367-5480, ^bORCID: 0000-0001-7848-3899

Geliş Tarihi: 20.07.2020

Kabul Tarihi: 18.01.2021

Özet: Su sakağısı, atlarda *Streptococcus equi subsp. equi* (*S. equi*)'nin neden olduğu akut seyirli, bulaşıcı ve irinli lenfadenitisle karakterize bir hastalıktır. Hastalık genellikle taylarda görülür ve hastalıkta üst solunum yolu ile ilgili bölgesel lenf nodüllerinde veya ender olarak da generalize formda apseleşme görülür. Hastalık tüm yaşlardaki tek tırnaklıları etkiler. Bu çalışmada atlardan *S. equi* izolasyonu ve izolatların PCR ile moleküler olarak identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık profillerinin saptanması amaçlandı. Bu amaçla materyal olarak 60 attan alınan burun svabı ve tracheal yıkantı sıvısı örnekleri kullanıldı. Örneklerin kolistin ve nalidiksit asit içeren kanlı agar ekimleri yapılarak, %5 CO₂'li ortamda 37 °C inkubasyona bırakıldı. Örneklerin kültür yoluyla incelenmesi sonucunda 22'sinden (%36) *Streptococcus* spp. izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen 22 suşun, 3'ü (%19,1) *S. equi*, 19'u (%20,6) *Streptococcus zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) olarak identifiye edildi. İzolatların superoxide dismutase-*sodA* gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda 3 *S. equi* ve 19 *S. zooepidemicus* izolatının tamamında 230 bp'lik bantlar gözlemlendi. *Streptococcus equi* etkenlerinin tür düzeyinde identifikasyonu için yapılan, pyrogenic exotoxin L (*seel*) gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda 520 bp'lik bant görüldü. Elde edilen 22 izolatın hepsi moleküler olarak tür düzeyinde doğrulandı. Antibiyogram testi sonucunda izolatların trimetoprim-sulfametoksazol, enrofloxacin, teicoplanin, imipenem'e duyarlı oldukları, clindamycin, neomycin, vancomycin, gentamicin, cefoxitin, penicilin G, kanamycin, streptomycin antibiyotiklerine ise farklı oranlarda duyarlılık saptandı. Sonuç olarak, *S. zooepidemicus*'un hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceği ve bu nedenle etkenin göz ardı edilmemesi gerektiği, *S. zooepidemicus* ve *S. equi*'nin identifikasyonunda PCR testinin yararlı olduğu görüldü. Antibiyogram testi sonucunda, özellikle aminoglikozidlere karşı bir direncin bulunduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: PZR, *S. equi*, Su sakağısı.

The Molecular Identification and Antibiotic Sensitivity of *Streptococcus equi* Strains Isolated from Horses

Abstract: Strangles is a contagious and acute disease in horses characterized by suppurative lymphadenitis and caused by *Streptococcus equi subsp. equi*. The disease is usually seen in young foals. Abscessation in lymph nodes of the upper respiratory system is seen and rarely it is in generalized abscessation form. Strangles affect equines of all ages. In this study, it was aimed to isolate *S. equi* from horses and perform a molecular identification of the agent by PCR. It was also aimed to determine antibiotic sensitivity profiles of the isolates. For this purpose, tracheal washings and nasal swabs were collected from 60 horses. At the end of cultural studies, a total of 22 (36%) *Streptococci* isolation were made. Out of 22 isolated strains tested, 3 (19.1%) and 19 (20.6%) were identified as *S. equi* and *S. zooepidemicus*, respectively. All isolates were verified by PCR. Amplification of *SodA* gen region of isolated strains yielded 230 bp DNA bands in agarose electrophoresis in both 3 *S. equi* and 19 *S. zooepidemicus* isolates. For species level molecular identification, amplification of *Seel* gen region was made by using specific primers and 520 bp DNA bands were observed in gels under UV light. According to the antibiotic sensitivity test results, all isolates were sensitive to trimetoprim-sulfametoksazol, enrofloxacin, teicoplanin, imipenem; sensitivity to clindamycin, neomycin, vancomycin, gentamicin, cefoxitin, penicilin G, kanamycin, streptomycin was found relatively lower. At the end of the study, it was concluded that *S. zooepidemicus* could play a role in the disease besides *S. equi*. Therefore, this should be taken for consideration. It was also noted that PCR for molecular identification for *S. equi* and *S. zooepidemicus* might be a useful tool. Antibiotic sensitivity tests showed that there is a resistance to especially aminoglycosides.

Keywords: PCR, *S. equi*, Strangles.

Giriş

Atlarda performans düşüklüğüne neden olan hastalıkların başında solunum sistemi hastalıkları gelir. Safkan Arap ve İngiliz atı yetiştiricilerinin de karşılaştığı önemli sorunlardan birisi üst solunum yolları hastalıklarıdır. Su sakağısı, atlarda *S. equi*'nin

neden olduğu akut seyirli, bulaşıcı ve irinli lenfadenitisle karakterize bir hastalıktır (Art ve ark., 2012). Hastalık genellikle genç taylarda görülür ve hastalıkta üst solunum yolu ile ilgili bölgesel lenf nodüllerinde veya ender olarak da generalize

formda apseleşme görülür. Hastalık tüm yaşlardaki tek tırnaklıları etkiler. Klinik bulgular genç hayvanlarda belirgindir. Kalabalık, yetersiz havalandırma, barınak problemleri, yer değiştirme ve yarış gibi stres yaratan faktörler hastalığa predispozisyon yaratmaktadır (Arias, 2013).

Hastalığın teşhisinde, klinik bulgular önemli olmasına karşın laboratuvar sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi hem teşhis hızı hem de ekonomik açıdan at popülasyonu ve yetiştiriciler için önem arz etmektedir. Su sakağasının klasik laboratuvar tanısında kültür yöntemi altın standart olarak bildirilmiştir (Sellon ve Long, 2013). Ancak diğer grup β -hemolitik streptokoklar ile *S. equi* kültür yoluyla ayrımı zor olduğundan dolayı PCR temelli tanı yöntemleriyle *S. equi* hızlı ve kolay bir şekilde tanıya edilebilmektedir. Antifagositik-M proteinin (SeM) PCR ile *S. equi* suşları tanıya edilebildiği bildirilmiştir (Chanter, 1997). Günümüzde, farklı bakteriyel hastalıklara karşı korunmada kemoterapotik ajanların kullanımı sıklıkla başvurulan yöntemlerdir. Yanlış ilaçların kullanımı antibakteriyel direnç kazanımı sonucunu da beraberinde getirmektedir. Antibiyotik duyarlılık testiyle uygun antibiyotik kullanımı sağlanarak hastalığın kısa sürede uygun bir şekilde tedavi edilmesi sağlanabilmektedir (Sweeney ve ark., 2004).

Atlarda solunum problemleri at yetiştiriciliğinin en önemli problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışma da atlardan kültür yoluyla *S. equi* izolasyonu ve bu izolatların PCR ile moleküler olarak tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık profillerinin saptanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmanın etik kurul raporu, Dollvet A.Ş Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Yetki numarası: DOLLVET-HADYEK-2016/29) alınmıştır.

Bu tez çalışmasında, 32 burun sıvabı ve 28 trakeal aspirasyon sıvısı olmak üzere toplam 60 örnek *S. equi* ve *S. zooepidemicus* yönünden incelendi. Steril olarak alınan örnekler soğuk zincirde en kısa sürede laboratuvara ulaştırılarak incelendi.

Bu çalışmada, örnekler 28 İngiliz ve 32 Arap atından alındı. Bu hayvanların 30 (%50)'u dişi 30 (%50)'u ise erkek idi. Örnek alınan atların 26'sı (%43,3) 1-3 yaş, 19'u (%31,6) 4-6 yaş, 15'i (%25) ise 7 yaşından büyük olduğu kaydedildi.

Kültür: Trakeal aspirasyon sıvısı 600 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra besi yerlerine ekimleri gerçekleştirildi. Burun svapları ve santrifüjden sonra elde edilen peletler kolistin ve nalidiksit asit içeren kanlı agara (Columbia Agar

Base, Oxoid CM331) ekimler yapıldı ve %5 CO₂ ortamda 37 °C inkubasyona bırakıldı. 24-48 saatlik inkubasyon sonunda tipik β - hemolitik streptokok benzeri kolonilerin alt kültürleri yapıldı. Şüpheli kolonilerin koloni morfolojileri, gram boyama, katalaz ve karbonhidrat fermentasyon testleri gibi biyokimyasal testlerle yapılarak identifikasyonları standart yöntemlere göre yapıldı (Quinn ve ark., 2004).

Moleküler Teknikler: DNA ekstraksiyonu: Alber ve ark. (2004)'nın bildirdiği yöntemle yapıldı. Kısaca 1 μ l mutanolysin (5U/ μ l) içeren TE buffer (10 mmol/l Tris-HCL, 1 mmol/l EDTA, pH 8) içerisinde koloniler süspansiyon edildi ve 37 °C'lik su banyosunda 60 dakika bekletildi. Daha sonra süspansiyon 56 °C'de 120 dakika proteinaz K ile muamele edildi. Süspansiyon 100 °C'de 15 dakika kaynatıldıktan sonra üst kısım alınarak amplifikasyonda kullanılmaya kadar 20 °C'de saklandı.

PZR: Aynı reaksiyon karışımı ve aynı şartlarda *SodA* ve *Seel* primerleri kullanılarak iki ayrı PZR yapıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Kullanılan Primer Dizileri

Hedef	Sekans (5'-3')	PCR ürün büyüklüğü (bp)
<i>Seel</i>	seel F 5'GAA GGT CCG CCA TTT TCA GGT AGT TTG 3', seel R 5'GCA TAC TCT CTC TGT CAC CAT GTC CTG 3'.	520
<i>SodA</i>	sodA equi/zooep F5'CAG CAT TCC TGC TGA CAT TCG TCA GG 3'. sodA equi/zooep R5' CTG ACC AGC CTT ATT CAC AAC CAG CC 3'.	230

PZR reaksiyon karışımı; 2 μ l template DNA, 0.4 μ l dNTP karışımı, 0.7 μ l primerler (seel F, seel R), 2 μ l reaksiyon buffer, 0.2 μ l Taq DNA polimeraz ve son hacmi 20 μ l olacak şekilde steril distile sudan oluştu. PCR inkübasyon sıcaklık ve süreleri sırasıyla, 95 °C'de 15 dakikalık ilk denatürasyon, takiben 94 °C'de 30 saniyelik denatürasyon, 59 °C'de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 40 saniye ekstensiyonu içeren 30 siklus ve 72 °C'de 5 dakikalık final ekstensiyonundan oluştu (Alber ve ark., 2004).

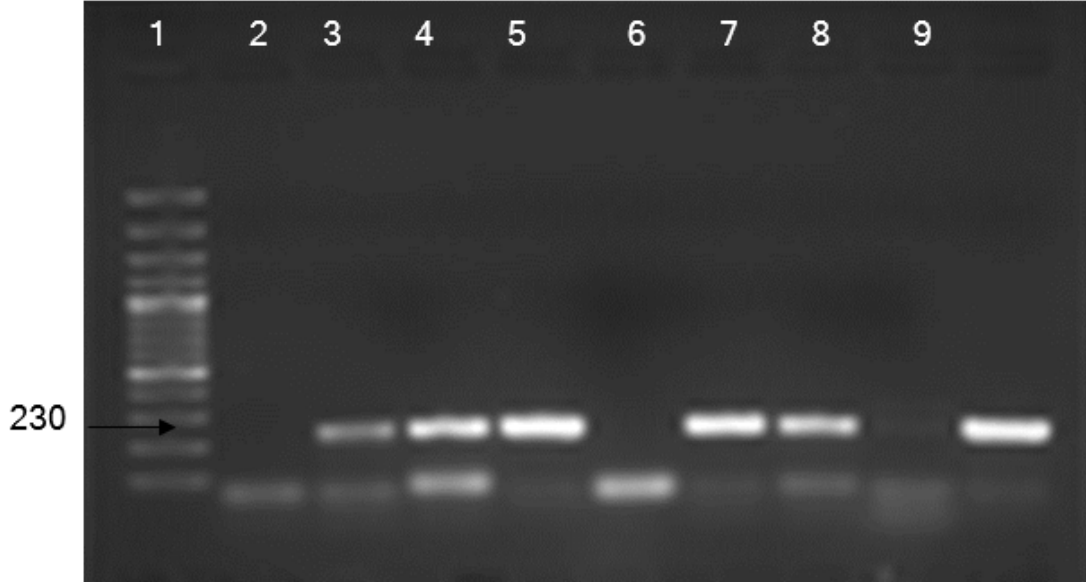
PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi: PZR sonucunda amplifiye edilen ürünler, TAE buffer kullanılarak %1'lik agaroz jel'de elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirildi.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi: *S. equi* ve *S. zooepidemicus* olarak tanıya edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları "National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI)" (M2-A6) önerilerine uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla TSB (Tryptone Soya Broth, CM0129, Oxoid) bulunan tüplere ekimler gerçekleştirilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda 0.5 Mc Farland yoğunluğuna göre getirilen kültürler Mueller Hinton Agar (CM0337, Oxoid) petrilere svap yardımıyla

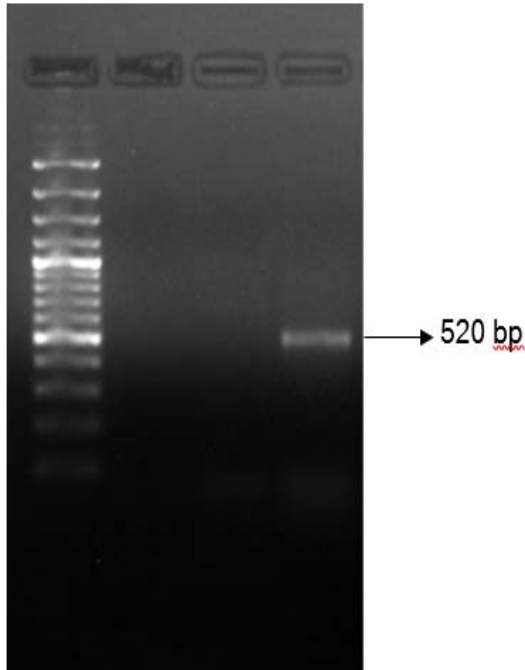
ekimleri gerçekleştirilerek kurumaya bırakıldı. Standart antibiyotik diskleri pens yardımı ile eşit aralıklarla petriye yerleştirildi. Petriler 37 °C'de 18 saat inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrasında inhibisyon zon çapları ölçüldü ve standart zon çapları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" karşılaştırıldı ve sonuca göre "duyarlı" veya

"dirençli" olmak üzere değerlendirildi (Patel ve ark., 2015).

Bu amaçla enrofloxacin (10 ug), imipenem (10 ug), clindamycin (2 ug), neomycin (10 ug), teicoplanin (30 ug), vancomycin (30 ug), gentamicin (10 ug), cefoxitin (30 ug), penicilin G (10 U), kanamycin (30 ug), streptomycin (10 ug) kullanıldı.



Şekil 1. *S. equi* ve *S. zooepidemicus* sod A spesifik PZR ürünü. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) 1-Negatif kontrol (*S. pyogenes*), 2,3,4- *S. equi* pozitif suşlar. 6,7,9. *S. zooepidemicus*, 5, 8, Negatif örnekler.



Şekil 2. *Streptococcus equi* spesifik PCR ürünü. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). 1-2 negatif örnekler 3. Pozitif örnek

Bulgular

İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları: Bu çalışma da incelenen 60 örneğin 22'sinden (%36) streptokok izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen 22 izolatın, 3'ü (%19) *S. equi*, 19'u (%20,6) *S. zooepidemicus* olarak tanımlandı.

PZR Bulguları: *SodA* gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda 3 adet *S. equi* ve 19 adet *S. zooepidemicus* suşlarının tamamında 230 bp'lik bantlar gözlemlendi (Şekil 1).

Streptococcus equi etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanması için yapılan, *Seel* gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda 520 bp'lik bant görüldü (Şekil 2). Sonuç olarak, konvansiyonel tekniklerle *Streptococcus spp.* olarak tanımlanan 22 adet suşun tamamı moleküler olarak doğrulandı.

İzole edilen etkenlerin antibiyogram sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Antibiyogram sonucunda trimetoprim-sulfametoksazol, enrofloxacin, teicoplanin, imipenem bütün suşlar duyarlı bulundu. Clindamycin, neomycin, vancomycin, gentamicin, cefoxitin, penicilin G, kanamycin, streptomycin antibiyotiklerine ise daha az oranda duyarlılık saptandı.

Tablo 2. İzole edilen etkenlerin antibiyogram testi sonuçları.

Antibiyotikler	<i>S. zooepidemicus</i>	<i>S. equi</i>
	Dirençli/Duyarlı (% Duyarlı) (n:19)	Dirençli/Duyarlı (% Duyarlı) (n:3)
Penisilin G (10 ug)	1/18 (% 94,7)	0/3 (% 100)
Trimetoprim- Sülfametoksazol (25 ug)	0/19 (% 100)	0/3 (% 100)
Enrofloxacin (10 ug)	0/19 (% 100)	0/3 (% 100)
Kanamisin (30 ug)	2/17 (%89,4)	2/1 (% 33,3)
Gentamisin (10 ug)	3/16 (% 84,2)	1/2 (% 66,6)
Streptomisin (10 ug)	4/15 (% 78,9)	2/1 (% 33,3)
Neomisin (30 ug)	4/15 (% 78,9)	2/1 (% 33,3)
Vancomycin (30 ug)	0/19 (% 100)	1/2 (% 66,6)
Teicoplanin (30 ug)	0/19 (% 100)	0/3 (% 100)
Cefoxitin (30 ug)	2/17 (%89,4)	0/3 (% 100)
Imipenem (10 ug))	0/19 (% 100)	0/3 (% 100)
Clindamycin (2 ug)	1/18 (% 94,7)	0/3 (% 100)

Tartışma ve Sonuç

Su sakağısı, çok fazla bulaşma özelliğine sahip *S. equi* tarafından oluşturulan, genellikle taylarda üst solunum yollarında ve bölgesel lenf yumrularının iltihaplanması ile karakterize, akut seyirli bir enfeksiyondur. Stres, bakımsızlık, iklim değişiklikleri gibi faktörler hazırlayıcı faktörlerdir. Hastalık burun akıntıları ve etkilenen lenf yumrularında bulunan irin ile kolayca saçılabilir. Hastalık at endüstrisinde oldukça önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Piche, 1984).

Streptococcus zooepidemicus çoğunlukla atların üst solunum sisteminde kommensal olarak bulunan *S. equi* ile yakın akrabalığı olan bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir. *S. zooepidemicus* kısırlıklarda metritis ve atlarda kornea ülseri gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca atların bademciklerine yerleşen *S. zooepidemicus* suşlarının, patojenik suşları kapsadığı da belirtilmiştir. *S. zooepidemicus* solunum sisteminde ciddi hastalıklara neden olan fırsatçı bir bakteridir. Ayrıca mukoza da kommensal olarak bulunmakla beraber su sakağısı benzeri semptomlar gösteren atlardan da izole edilmiştir (Erol ve ark., 2012).

Erol ve ark. (2012), atlarda hemolitik streptokok türlerini araştırdıkları bir çalışmada, *S. zooepidemicus*'un en sık izole edilen tür olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, plasenta, fetal doku, solunum sistemi, nasal örnekleri ve lenf düğümü apseleri gibi çeşitli organlardan %72 oranında izolasyon bildirmişlerdir. Araştırmacılar etkeni temel olarak lenf düğümü apsisi, nasal svaplar, üst ve alt solunum kanalından izole etmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmada, %5,8 gibi düşük bir oranda fetal doku ve plasentadan *S. equi* suşları izole edilmiştir (Erol E ve ark., 2012).

Khoo ve ark. (2011), 2010 yılında 2825 burun,

9 trakeal, 1 submandibular svab ve 1 submandibular apsenden aldıkları örnekleri kültür yoluyla inceledikleri çalışmada, 2 burun svabı ve 1 submandibular apsenden *S. equi* izole etmişlerdir. Çalışmada 2847 örnekten 3 (%0,1) izolasyon oranının çok düşük olduğunu belirtmişlerdir. Yeni Zelanda'da *S. equi*'nin PZR ile identifikasyonunun amaçlandığı bir çalışmada 168 attan örnekler alınmıştır (Patty ve Cursons, 2014). Bu örneklerin PZR ile incelenmesi sonucunda 35 (%20,8) attan PZR ile pozitiflik saptanmıştır. Araştırmacılar (Patty ve Cursons, 2014), PZR'testinin hastalığın teşhisinde hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Jannatabadi ve ark. (2008), 30 attın üst solunum yollarından burun svabı aldıkları çalışmada 1 (%0,3) adet *S. equi* ve 24 (%80) adet *S. zooepidemicus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Mir ve ark. (2013), Hindistan'da 88 baş sağlıklı ve 53 baş solunum yolu hastalığı bulunan atlarda, üst solunum yollarında aerobik bakterileri izole ettikleri çalışmada, her iki gruptan izole edilen toplam 321 izolattan %84,11'i gram pozitif ve %15,88'i gram negatif bakteri olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, %7,44 oranında *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ve %1,24 oranında *Streptococcus equi* subsp. *equi* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada (Diri M, 2018), 133 numuneden 2 *Streptococcus* spp. (%1,2) (1 *Streptococcus equi* subs. *zooepidemicus* ve 1 *Streptococcus pneumoniae*) etkeni izole edilmiştir. Çalışmada doğal florada bulunan Gram negatif bakterilerin baskılayıcı etkisinden dolayı bakteri oranının düşük çıktığı belirtilmiştir.

Bu çalışmada, 60 su sakağısı şüpheli attan alınan örneklerden, 3 (%0,5) adet *S. equi* ve 19 (%31,6) adet *S. zooepidemicus* izole ve identifiye edildi. *S. zooepidemicus*'un daha yüksek ve *S. equi* izolasyon oranındaki düşüklük, diğer çalışmalardan

elde edilen izolasyon oranlarına benzer bulunmuştur (Diri M, 2018). Farklı bölgeler de yapılan çalışmalarda izolasyon oranları değişebilmektedir. Antibiyotik kullanılması, florada diğer bakteriyel etkenlerin varlığı izolasyon oranlarını etkileyebilmektedir.

S. equi'nin klasik identifikasyonu fenotipik özellikleri, morfoloji, serolojik ve biyokimyasal özelliklerine bağlıdır. Ancak klasik izolasyon için uzun zaman gereklidir ve atipik suşlar gözden kaçabilmektedir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından hızlı spesifik ve duyarlı moleküler tanı yöntemlerinden klasik PZR metodları geliştirilmiştir (Alber ve ark., 2010; Patty ve Cursons, 2014).

Alber ve ark. (2010), *S. equi*'ye spesifik Seel ve hem *S. equi* hemde *S. zooepidemicus*'a spesifik Soda genlerini temel alan PZR geliştirdikleri çalışmada her iki türü başarılı bir şekilde ayırt ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda izole edilen bütün suşlar PZR testi ile doğrulanmıştır. PZR testinin, izole edilen her iki türün ayırımında başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmüştür.

Kuzey Amerika'da, 755 *S. zooepidemicus*'un izolatının ceftiofur ve 6 antibiyotiğe karşı invitro aktivitesi incelenmiş. Ceftiofura, *S. zooepidemicus* izolatlarının %90'nının duyarlı olduğu bildirilmiştir (Bade ve ark., 2009). Bu çalışmada cefoxitine duyarlılığın %89,4 olarak bulunması Bade ve ark. (2009)'nın bulgularına benzer olarak görülmüştür. Johns ve ark. (2012), Atlardan alınan klinik örneklerden izole edilen bakterilerin, antimikrobiyal direnç değişimlerini inceledikleri bir çalışmada enrofloxacin, ceftiofur, gentamicin, penicillin G, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline duyarlılıklarını incelemişlerdir. İzolatları iki gruba ayırmışlardır. İlk grupta 1999-2004 yılları arasında izole edilenler, diğer grupta ise 2007-2012 yılları arasında izole edilen bakterilerden oluşmuştur. Streptokok türlerinde direnç oranında önemli artışlar olduğunu belirlemişlerdir. Bütün Streptokok türlerinin ilk grupta enrofloksasine direncin sıfır olarak görülmesine karşın ikinci grupta bu oranın %63 seviyelerine çıktığını bildirmişlerdir. Ayrıca tetrasiklin ve çoklu antibiyotik direncinin *S. zooepidemicus* suşlarında arttığını ve trimethoprim-sulfamethoxazole direncinin ise azaldığını belirtmişlerdir. Antibiyotik direncinin artmasının yaygın ilaç kullanımına bağlamışlardır.

Sauer ve ark. (2003), atların ülseratif keratitisi olgularından 65 izolatın 13'ünü (%20) *S. zooepidemicus* olarak tanımlamışlardır. Bu izolatların 1993 -1997 yılları arasında 1/5'inin (%20) gentamisine dirençli iken 1998- 2000 yılları arasında 4/8'sinin (%50) gentamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu direnç oranının istatistiksel olarak önemli olduğunu belirtmişlerdir. Diğer

antibiyotiklerde bir değişim görmedikleri çalışmada 13 izolatın tamamını bacitracin, ampicillin, chloramphenicol ve carbenicilline duyarlı bulmalarına karşın, neomycin ve kanamycine karşı direnç şekillendiğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada Luque ve ark. (2006), endometritis klinik belirtileri olan kısıraklardan izole edilen 65 *S. zooepidemicus*'un β -lactam, enrofloksasin, trimetoprim-sulfamethaksazole ve gentamisine duyarlı olduğunu bildirilmiştir. Araştırmacılar aminoglikozid duyarlılığının değişken olduğunu, amikasine ve karşı yüksek oranda (%98,5) direnç tespit ederken, gentamisin duyarlılığını yüksek (%98,5) olarak bildirmişlerdir. Erol ve ark. (2012), 2497 β - hemolytic streptokok etkenin direnç profillerini inceledikleri çalışmada, genel olarak suşların, cephalothin, erythromycin, nitrofurantoin, penicillin, ticarcillin ve clavulanate duyarlı olduğu, gentamicin, tetracycline, novobiocin, ve bacitracine daha az duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Hastalığın tedavisinde tercih edilen ilaçlar olarak penicillin, sefalosporin ve makrolidler karşımıza çıkmaktadır. CLSI standartlarına göre yapılan antibiyogram test sonuçları temel alındığında *S. equi* izolatların büyük çoğunluğunun trimetoprim-sulfadiazine duyarlı olduğu görülmüştür. Diğer birçok antibiyotiğe karşı direncin düşük olduğu görülmüştür. Streptokok etkenlerine karşı gentamisin içeren aminoglikozid direnci gözlenebilmektedir. Antibiyotik direnç gelişimi antibiyotik kullanımına bağlı olduğundan, yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz antibiyotik direnç sonuçları diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, özellikle aminoglikozidlere karşı direnç bulunması, diğer araştırmacıların bulgularına benzer olarak görülmüştür.

Çalışmada, incelenen örneklerin 22'sinden (%36) Streptokok izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen suşlardan 3 (%0,5) adeti *S. equi* ve 19 (%31,6) adeti *S. zooepidemicus* olarak belirlendi. Bu sonuç, genel olarak *S. zooepidemicus*'un hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceğini ve bu nedenle etkenin göz ardı edilmemesi gerektiğini, *S. zooepidemicus* ve *S. equi*'nin identifikasyonunda PZR testinin yararlı olduğunu ve türlerin ayrılmasında oldukça etkin bir şekilde kullanılabileceğini ve izole edilen etkenlerin genel olarak antibiyotiklere duyarlı olduğu, ancak aminoglikozidlere karşı direncin oluştuğunu gösterdi. Bu çalışmada elde edilen bulgular çerçevesinde, su sakağısının etiolojisinin belirlenmesine ve kontrol programlarının düzenlenmesi ile de streptokok ve diğer etkenlere bağlı enfeksiyonların çözümüne önemli katkılar sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından, 17056 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Art T, Mc Gorum B, Lekeux P, 2012: Environmental Control of Respiratory Disease. *IVIS*, Ithaca, New York, USA.
- Arias MP, 2013: Strangles: The most prevalent infectious respiratory disease in horses worldwide. *Rev CES Med Zootec*, Vol 8 (I), 143-159.
- Alber J, El-Sayed A, Lämmle C, Hassan AA, Weiss R, Zschöck M, 2004: Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51(10), 455-458.
- Bade DJ, Sibert G, Hallberg J, Portis E, Boucher J, Bryson W, 2009: Ceftiofur susceptibility of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from horses in North America between 1989 and 2008. *Vet Ther*, 10(4), E1-7.
- Chanter N, 1997: Streptococci and enterococci as animal pathogens. In: Symposium Series-Society for Applied Bacteriology (United Kingdom). Suppl, 83, 1005-1095.
- Diri M, 2018: Türkiye'deki yarış atlarının solunum yollarından izole edilen *Streptococcus* spp ve *Staphylococcus* spp etkenlerinde antibakteriyel ilaçlara direncin tespit edilmesi. Doktora Tezi, Ankara Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erol E, Locke SJ, Donahoe JK, Mackin MA, Carter CN, 2012: Beta-hemolytic *Streptococcus* spp. from horses: a retrospective study (2000–2010). *J Vet Diagn Invest*, 24 (1), 142-147.
- Johns IC, Adams EL, 2015: Trends in antimicrobial resistance in equine bacterial isolates: 1999-2012. *Vet Rec*, 176 (13), 334-334.
- Jannatabadi, AA, Mohammadi GR, Rad M, Maleki M, 2008: Molecular identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in nasal swabs samples from horses suffering respiratory infections in Iran. *PJBS*, 11 (3), 468-471.
- Khoo LL, Maswati MA, Roseliza R, Rosnah Y, Saifu Nazri R and Ramlan M. 2011. Isolation of streptococcus equi during strangles surveillance in peninsular Malaysia. *Malaysian Journal of Veterinary Research*, 2, 27-32.
- Luque I, Fernández-Garayzábal JF, Blume V, Maldonado A, Astorga R, Tarradas C, 2006: Molecular Typing and Anti-microbial Susceptibility of Clinical Isolates of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* from Equine Bacterial Endometritis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53 (9), 451-454.
- Mir IA, Kumar B, Taku A, Wani N, Faridi FN, Dar SA, Gazal S, Badroo GA, Zargar AA and Iqbal A, 2013: The study of aerobic bacterial flora of the upper respiratory tract of equines from Jammu and Kashmir region of India. *Veterinary World*, 6 (9), 623-627.
- Patel JB, Cockreilli F, Bradford P, Eliopoulos G, Hindler J, Jenkins S, 2015: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement; M100-S25. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Patty OA, Cursons RTM, 2014: The molecular identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* strains isolated within New Zealand. *NZVJ*, 62 (2), 63-67.
- Piche CA. 1984: Clinical observations an outbreak of strangles. *Can Vet J*, 25:711.
- Sauer P, Andrew SE, Lassaline M, Gelatt KN, Denis HM, 2003: Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991–2000): 65 horses. *Vet Ophthalmol*, 6 (4), 309-313.
- Sellon DC, Long M. 2013: Equine Infectious Diseases E-Book. *Elsevier Health Sciences*.
- Sweeney CR, Timoney JF, Newton JR, Hines MT, 2005: *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J Vet Intern Med*, 19 (1), 123-134.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, 2004: *Clinical veterinary microbiology*. Mosby. Elsevier, London.

*Yazışma Adresi: Osman Yaşar TEL

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail:oyasar@gmail.com

Association of BRCA1 (G22231T, T25025A, C28300A) polymorphisms with subclinical mastitis and milk yields in Holstein Cattle

Fadime DALDABAN^{1,a,*}, Korhan ARSLAN^{1,b}, Aytaç AKÇAY^{2,c}, Mahmodul Hasan SOHEL^{1,d},
Bilal AKYÜZ^{1,e}

¹Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey.

²Department of Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

^aORCID: 0000-0001-5795-8859, ^bORCID: 0000-0002-2440-884X, ^cORCID: 0000-0001-6263-5181, ^dORCID: 0000-0003-2224-085X, ^eORCID: 0000-0001-7548-9830

Geliş Tarihi: 19.10.2020

Kabul Tarihi: 17.02.2021

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the relationship between three SNP on the *BRCA1* gene and subclinical mastitis, as well as milk yields during four lactation periods in Holstein breed cattle. The animal material of the study consisted of 151 Holstein cows reared under the same care and feeding conditions. Complete DNA was isolated from blood samples by using phenol: chloroform: isoamyl alcohol method. Genotyping of G22231T, T25025A and C28300A SNPs on the *BRCA1* was done by the PCR-RFLP method. Subclinical mastitis of animals was determined in milk samples by California Mastitis Test (CMT). In the study, CMT data, four lactation periods' milk yields, and proportional distributions of SNP genotypes were calculated. Statistical significance of the data was determined by the Pearson chi-square test. The relationship between C28300A SNP, which was monomorphic, and subclinical mastitis has not been analyzed. In the samples examined, the difference between the proportional distribution of SNP genotypes of G22231T and T25025A in subclinical mastitis and healthy groups was not found statistically significant ($P>0.05$). As a result of the Chi-square (χ^2) analysis conducted, it was observed that the Holstein cattle were in the Hardy-Weinberg equilibrium in terms of G22231T and T25025A SNPs. Considering the physiological processes in which the *BRCA1* gene is involved, it was thought that these genes and SNPs should be evaluated with more samples in studies on resistance to mastitis.

Keywords: *BRCA1 gene, Holstein, Mastitis, PCR-RFLP.*

BRCA1 (G22231T, T25025A, C28300A) polimorfizmlerinin Holştayn Sığırlarında subklinik mastitis ve süt verimi ile ilişkisi

Özet: Bu çalışmanın amacı Holstein ırkı sığırlarda *BRCA1* geninde meydana gelen üç farklı tek nokta mutasyonun, subklinik mastitis ve süt verimi arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Bu amaçla hayvan materyali olarak aynı bakım ve beslenme koşullarına sahip 151 dişi Holstein ırkı sığır seçildi ve bu sığırların dört laktasyon dönemi boyunca verim kayıtları kullanıldı. Total DNA, kan örneklerinden fenol:kloroform:izoamil alkol yöntemiyle izole edildi. Elde edilen DNA örneklerinden *BRCA1* genindeki G22231T, T25025A ve C28300A tek nokta mutasyonları için PCR-RFLP yöntemi ile genotipleme yapıldı. Hayvanlarda subklinik mastitisinin bulunup bulunmadığı, süt örneklerine yapılan California Mastitis Testi (CMT) ile belirlendi. Çalışmada CMT verileri, dört laktasyon dönemi süt verim bilgileri ve tek nokta mutasyonları sonucu ortaya çıkan genotiplerinin orantılı olarak dağılımları hesaplanmıştır. Verilerin istatistiksel anlamlılığı Pearson ki-kare testi ile yapılmıştır. İncelenen örneklerde monomorfik olan C28300A tek nokta mutasyonunun subklinik mastitis ile bir ilişkisi analiz edilmemiştir. G22231T, T25025A tek nokta mutasyonlarından sonra oluşan genotiplerin ise orantılı dağılımı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Yapılan Ki-kare (χ^2) analizi sonucunda Holstein ırkı sığırların G22231T ve T25025A tek nokta mutasyonları açısından Hardy-Weinberg dengesinde olduğu görülmüştür. *BRCA1* geninin görev aldığı fizyolojik süreçler göz önüne alındığında mastitise direnç ile ilgili çalışmalarda bu gen ve SNP'lerin daha çok örnekle değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *BRCA1 Geni, Holstein, Mastitis, PCR-RFLP.*

Introduction

Several reasons including personal taste and level of income greatly influence food consumption habits. Milk and dairy products play an important role in the adequate and balanced nutrition of people. Among the milk and dairy products consumed throughout the world, approximately 96% is obtained from large ruminates such as cattle and buffalo (Yalçın and Argun, 2017). Among the

existing cattle breeds, the Holstein breed has been the most popular dairy cattle breed in the world regardless of geography and climatic belt because of high milk yield capacity, the suitability of the udder structure and the teat structure to modern milking systems (Yaylak et al., 2015). In addition to milk yielding capacity, Holstein males have been shown to be good quality meat producers. In the

last few decades, the primary objective of Holstein breeding was to improve production traits such as milk yield, whereas others such as reproductive and disease-related traits were overlooked. Therefore, despite the high milk yield of Holstein cattle, their reproductive performance is poor and they are susceptible to many diseases including mastitis (Blöttner et al., 2011). Selection studies to increase milk yield in dairy cattle reduced resistance to mastitis due to the negative correlation between them. For example, due to the genetic correlation between milk fat or protein yield and mastitis ranging from 0.25 to 0.50, long-term selections to improve these properties have led to a decrease in resistance to mastitis (Weigel and Shook, 2018). Therefore, breeding strategies for improving resistance to diseases stands out as an important feature (Egger-Danner et al., 2014). In the case of dairy cattle, several diseases including tuberculosis, brucellosis, and mastitis cause significant economic losses. It is important to note that vaccination and restrictions on the movement of animals and animal products could decrease the prevalence of diseases like tuberculosis and brucellosis, especially in developed countries (Claridge et al., 2012). However, mastitis, which is defined as the inflammatory response of the mammary gland to microbial, traumatic, or toxic agents, is common all over the world. Mastitis is a disease that causes serious economic losses in dairy cows by significantly reducing the quality and quantity of milk (Halasa et al., 2007; Kumar et al., 2010; Weigel and Shook, 2018). In addition, mastitis significantly increases the risk of the culling of animals by 2-4 folds due to problems related to conception as well as the continuation of the pregnancy (Weigel and Shook, 2018). At the same time, the use of antibiotics to treat mastitis accounts for half of all antibiotics used in a dairy farming, causing significant economic losses and environmental pollution (Francoz et al., 2017; Saini et al., 2012; Weigel and Shook, 2018).

Although a combination of early diagnosis and effective antimicrobial drugs have been at the forefront in the prevention of economic losses (caused by mastitis due to atrophy of the udder, loss of breeding value of the animal, and the long and expensive treatment process), there has been an increasing interest in the development of genetically mastitis-resistant flocks in recent years. Studies have shown that there is a strong relationship between some genes and resistance to mastitis. Therefore, there is increasing interest in developing mastitis-resistant herds. (Asaf et al., 2014a; Asaf et al., 2014b; Jacob et al., 2018; Rupp et al., 2007; Tolone et al., 2016; Youngerman et al., 2004). Breast cancer 1 (*BRCA1*) gene is one of those

genes that has been reported to be associated with hereditary breast cancer risk in humans (Friedman et al., 1994) as well as mastitis in cattle (Yuan et al., 2012b).

The *BRCA1* gene, a member of the RING-type chain fingers (RNF) family, belongs to a class of genes known as tumor suppressor genes that encode proteins that help to prevent rapid growth and division of cells (Wang et al., 2000). Other tumor suppressors, together with DNA damage sensors and signal transducers, form a large, multi-part protein complex known as the BRCA1-related genome surveillance complex (BASC) (Wang et al., 2000).

The *BRCA1* gene, involved in the regulation of the cell cycle, is directly involved in the repair of DNA damage and other pathways involved in maintaining the stability of the genome (Wang et al., 2000). There are four transcript variants of the *BRCA1* gene (Krum et al., 2003), 6059 bp, 5550 bp, 5526 bp, and 2115 bp defined in the Ensemble database, and consist of 22 exons and 21 introns (Ensembl, 2020). *BRCA1* gene was found to be associated with the somatic cell score (SCS) (Bennewitz et al., 2004; Daetwyler et al., 2008). Studies have reported a positive correlation between SCS and mastitis in cattle, ranging from 0.30 to 0.98, with an average of 0.70 (Chu et al., 2012; Heringstad et al., 2006; Yuan et al., 2012). Therefore, a selection study to improve SCS may also contribute to the development of a mastitis-resistant dairy herd. In previous studies, it has been reported that there is a positive correlation between *BRCA1* gene and SCC which is positively correlated with mastitis. However, the relationship between different SNPs on the *BRCA1* gene and subclinical mastitis in Holstein cattle is not well understood. Therefore, the aim of this study was to investigate the relationship between lactation milk yields and subclinical mastitis with three different SNPs on the *BRCA1* gene in Holstein cows.

Material and Method

A total of 151 female Holstein cattle reared around Kayseri were used in this study. Ethics Committee Approval to use animal materials was obtained from Erciyes University Animal Experiments Local Ethics Committee on the date 11.12.2013, with an identification number of 13/157.

Subclinical Mastitis Test: California Mastitis Test (CMT) was employed to determine the subclinical mastitis conditions using milk samples. Briefly according to Fthenakis, 1995: in the 2 ml milk sample taken separately from the udder lobe of the animal was placed separately in the CMT test disc.

The CMT solution was added into the milk in the CMT disc and the CMT disc was shaken orbitally. If coagulation was observed, the presence of mastitis in the udder was concluded. In addition, the milk yield records for the first four lactations were examined.

DNA Isolation and PCR-RFLP: All lab procedures were performed according to the guidelines of the Local Ethics Committee for Animal Experiments at Erciyes University (14.06.2017 and 17/056). 9ml blood samples were collected from the vena jugularis of experimented animals into tubes containing EDTA . DNA was isolated from whole blood using the phenol: chloroform: isoamyl-alcohol method (Sambrook et al., 1989). The purity and concentration of isolated DNA were measured using a Nanodrop Spectrophotometer (BioTek, Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader). A PCR-RFLP was performed (Qiagen, Sensoquest) to investigate three SNPs, namely *BRCA1-1* (G22231T),

BRCA1-2 (T25025A), and *BRCA1-3* (C28300A), on the bovine *BRCA1* gene. The PCR reaction contained 2.5 mM MgCl₂, 50 µM dNTP mix, 0.2 µM forward and reverse primer, 1.25 U Taq DNA polymerase and 50 ng / µl DNA and nuclease free water to obtain a final volume of 20 µl for each sample. The thermal cycles of PCR reaction were set up as follows: a pre-denaturation temperature of 5 minutes at 94 °C, 30 seconds at 94 °C, 30 seconds at 72 °C, at the appropriate annealing temperature specified in Table 1 for each SNP region. After the number of cycles specified in Table 1 was completed, it was completed by standing at 72 °C for 7 min.

The amplicons obtained from PCR were visualized in a 2% agarose gel and the amplicons for each SNP were treated with the appropriate restriction enzymes (Table 1) at the appropriate temperatures. Genotypes of each individual were examined by 2% agarose gel electrophoresis.

Table 1. Primer and amplicon sizes of *BRCA1* gene SNP regions

SNP	Primary Sequence (3'-5')	AT	C	Amplicon	RE	Genotype	Bands(bp)	RET (°C)
G22231T	F CTCAGAACCTGACTTGTAACC	55	32	321 bp	<i>HhaI</i>	AA	272, 49	37
	R CAAGGAATATTTACTGAGCACC					AB	321, 272, 49	
						BB	321	
T25025A	F TGCAGTGGAAATTCCAAATAAACT	60	32	209 bp	<i>MaeI</i>	CC	185, 24	37
	R GAATTAGATCTTCAGCTATGTGGC					CD	209, 185, 24	
						DD	209	
C28300A	F AGAGGAAATCATCTGGGTGTCC	58.3	38	217 bp	<i>BspTI</i>	EE	190, 27	37
	R CCTGTGCTTTTTACCTGAGTGC					EF	217, 190, 27	
						FF	217	

F: Forward, R: Reverse, bp: Baz pair AT: Anneling Temperature, C: PCR Cyle RE: Restriction endonuclease, RET: Restriction endonuclease enzyme cutting heat

Statistical analysis: Based on the subclinical mastitis status of the animal, the mean and standard deviation values of lactation milk yields were calculated with the NCSS 9.0 package program. Proportional distributions of the genotypes determined according to three SNPs and regions on the *BRCA1* gene were calculated in accordance with the subclinical mastitis status and statistical significance controlled by the Pearson Chi-square test.

Results

Three different SNP regions in the *BRCA1* gene were genotyped by PCR-RFLP method.

The results of PCR-RFLP analysis for the *BRCA1* gene showed a 321 bp PCR band for G22231T, 209 bp for T25025A, and 217 bp for C28300A (Figure 1).

In G2223T region, two bands of 272 and 49 bp in individuals with AA genotypes, three bands of 321, 272, and 49 bp individuals with AB genotype, and one band of 321 bp individuals with BB genotype has been observed. In T2505AT region, two bands of 185 and 24 bp in individuals with CC genotypes, three bands of 209, 185, and 24 bp individuals with CD genotype, and one band of 209 bp individuals with DD genotype has been observed .For C28300A regions, the EF and FF genotypes were not found in animals examined. Enzyme cutting images of three SNPs in *BRCA1* gene are show in Figure 2. Bands used in genotype analysis of SNP regions are presented in Table 1.

Genotype frequencies of AA, AB and BB for the G22231T SNP region were 0.12, 0.54, and 0.31, respectively while allele frequencies of A and B alleles were 0.40 and 0.60, respectively (P>0.05).

Frequencies of CC, CD and DD genotypes for the T25025A SNP region were 0.68, 0.28, and 0.02,

respectively, while frequencies of C and D alleles were 0.83 and 0.17, respectively ($P>0.05$) (Table 2).

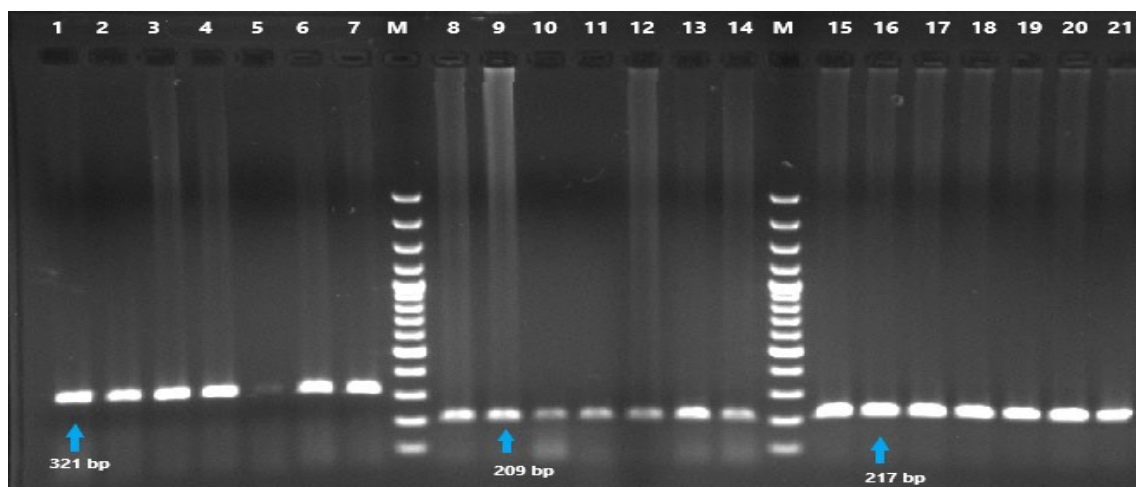


Figure 1. *BRCA1* gene SNP regions PCR result (1-7: 321 bp (G22231T SNP), 8-14:209 bp (T25025A SNP) and 15-21: 217 bp (C28300A SNP), M: 100 bp Ladder; bp: base pair)

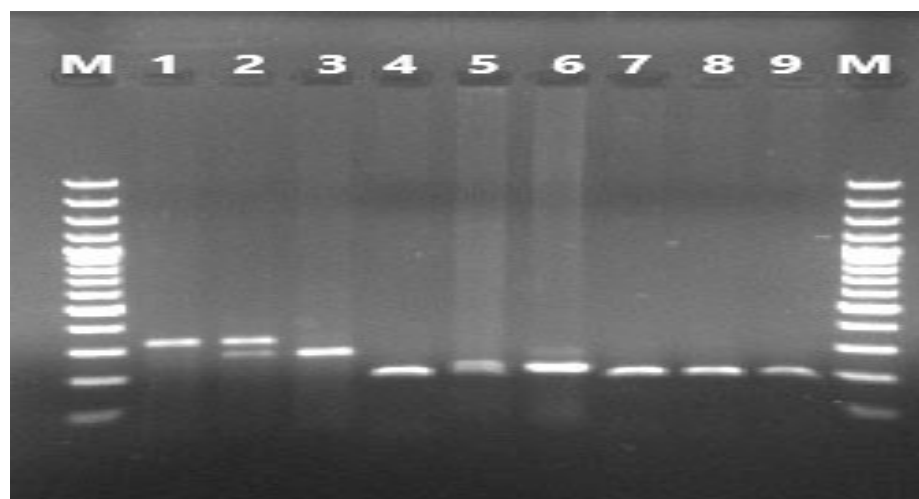


Figure 2: Enzyme PCR-RFLP images of three SNPs in the *BRCA1* gene (M: 100 bp ladder, 1: BB genotype, 2: AB genotype, 3: AA genotype, 4: CC genotype, 5: DD genotype, 6: CD genotype, 7-9: EE genotype)

Table 2. *BRCA1* gene allele and genotype frequencies in Holstein cattle

SNP	n	Genotype Frequency			Allele Frequency		χ^2	P-value
		AA	AB	BB	A	B		
G22231T		0.12 (n=19)	0.54 (n=83)	0.31 (n=48)	0.40	0.60	3.63 ^{NS}	0.056
T25025A	151	0.68 (n=104)	0.28 (n=43)	0.02 (n=4)	0.83	0.17	0.031 ^{NS}	0.85
C28300		1 (n=151)	0	0	1	0	-	-

n: Number of animals, χ^2 : Chi-square ^{NS}: Not significant

Since the examined samples were monomorphic in terms of C28300A polymorphism, the relationship between these SNPs and subclinical

mastitis could not be analyzed. No significant differences ($P>0.05$) were found between the subclinical mastitis and the proportional

distribution of genotypes in G22231T and T25025A SNPs. However, 57.8% (48/83) of subclinical mastitis positive (M +) animals carried AB genotype in terms of G22231T polymorphism, while for T25025A polymorphism, genotype CC showed the

highest frequency with 54.8% (57/104) (Table 4). In addition, 35.37% (29/82) of the cattle with subclinical mastitis (M +) were found to have both the G22231T gene AB and the T25025A gene CC genotype.

Table 3. Lactation milk yields according to subclinical mastitis status

Subclinical Mastitis	Lactation Milk Yields	N	Minimum	Maximum	Mean ±
					Std.Deviation
M(-)	Daily Milk Yield	69	13.6	31.2	24.8 ± 4.2
	Number of Days	69	278	418	346.0 ± 31.1
	Total Efficiency	69	4404.4	11180.8	8506.7 ± 1447.1
M(+)	Daily Milk Yield	82	12.8	31.1	24.3 ± 3.5
	Number of Days	82	285	440	356.9 ± 35.5
	Total Efficiency	82	4672.4	11290.6	8621.4 ± 1306.1

n: Number of animal samples

Table 4. Proportional distribution and statistical significance controls of genotypes according to subclinical mastitis status

SNP	Genotype	Genotype Frequency			Pearson ki-square test (P value)
		M(-)	M(+)	Total (n)	
G22231T	AA	11 (57.9%)	8 (42.1%)	19	0.452
	AB	35 (42.2%)	48 (57.8%)	83	
	BB	23 (46.9%)	26 (53.1%)	49	
T25025A	CC	47 (45.2%)	57 (54.8%)	104	0.437
	CD	21 (50.0%)	21 (50.0%)	42	
	DD	1 (20.0%)	4 (80.0%)	5	
C28300A	EE	69 (45.7%)	82 (54.3%)	151	-
	EF	-	-	-	
	FF	-	-	-	

M: Mastitis

Discussion and Conclusion

There are two types of mastitis known as clinical and subclinical mastitis, which are the most common in the dairy industry and cause serious economic loss (Gabielli et al., 2015). In the case of clinical mastitis, there are visible changes in milk and udder structure. However, changes in milk and udder in subclinical mastitis cannot be determined visually (Zorba and Tepeli, 2017). As a result of decreased milk yield in affected animals and the decreased quality of milk products due to the mixing of the milk obtained from sick animals with healthy milk, significant losses arise in both the enterprise and the national economy (Aytekin and

Boztepe, 2014; Guerrero et al., 2015). In fact, it has been reported that about 70% of the economic losses due to mastitis are caused by subclinical mastitis (Janzen, 1970). On the other hand, 45-60 subclinical cases have been reported for each clinical mastitis case in a dairy cattle herd (Çoban, 2007). Therefore, for the prevention of economic losses caused by subclinical mastitis, early diagnosis as well as the development of disease-resistant individuals are important and highly desirable by the producers.

The diagnosis of clinical mastitis in the field is very important and can be done using udder examination, physical properties of milk, somatic cell count, and ultrasonography. However, the

diagnosis of subclinical mastitis is comparatively difficult because the majority of the tests are dependant on indirect tests such as tissue damage-related enzyme (i.e. HDL and NAGase) examination, electronic conductivity, and California Mastitis Test (CMT). The majority of these tests are less sensitive and could give false-positive test results. Therefore, molecular techniques such as PCR-RFLP can be used to select animals that are genetically resistant or susceptible to subclinical mastitis.

In the current study, we investigated the relationship between subclinical mastitis and three SNPs in the *BRCA1* gene, which has been reported as a potential candidate gene to detect mastitis in Chinese commercial cattle (Yuan et al., 2012) and subclinical mastitis in buffaloes (Biendima and Ramos, 2017). Chi-square (χ^2) analysis showed that Holstein breed cattle were in Hardy-Weinberg equilibrium in terms of G22231T and T25025A coded SNPs. It is interesting to note that the G22231T coded SNP was found in all three genotypes, where the AB genotype was the most frequent (0.54). In agreement with our results, Yuan et al. (2012) reported that there are three genotypes in Holstein grown in China where the AB genotype (0.57) is the most common. In addition, the authors also investigated Scene and Simental breeds and reported that the AB genotype was the most common genotype in both breeds (Yuan et al., 2012). Comparatively a higher frequency of AB genotype (0.78) was reported in the crossbred of Holstein \times Sahiwal grown in India. Surprisingly, in contrast to our results, the authors reported an absence of BB genotype in the same population (Deb et al., 2014). The higher frequency of AB genotype and the absence of BB genotype in the crossbred population could be due to the presence of the Sahiwal breed (*Bos indicus*). However, further studies are required to confirm this hypothesis.

In the case of T25025A SNP, our results showed that in the cattle of Holstein breed, the CC genotype has the highest frequency (0.68), while the DD genotype has the lowest frequency (0.02). These results are consistent with the findings of Yuan et al. (2012b). In contrast to others and our results, Deb et al. (2014) did not observe any individuals with CC genotypes in Frieswal crossbred. This deviation could be due to the same reason as stated before- the presence of *Bos indicus* gene in that population. On the other hand, in the case of C28300A SNP, surprisingly, we found that all the animals carried EE genotype. In contrast to our results, Yuan et al. (2012b) showed the presence of all three genotypes (EE, EF, and FF) in the Holstein breeds reared in China, although the EE genotype showed the highest frequency.

In a study investigating the relationship between the three SNPs and somatic cell score in the milk (SCS) of the Holstein, Simental, and Sahne breeds, EE genotype of C28300A locus was reported to be associated with lower SCS (Yuan et al., 2012b). Similarly, Deb et al. (2014) reported that there is a relationship between AA genotype of G22231T locus as well as CD genotype of T25025A locus and SCS in the Frieswal race, a Holstein \times Sahiwal (*Bos indicus*) hybrid. Similar results were not obtained in two studies of the same feature. This difference may be due to the fact that while the study conducted by Yuan et al., 2012 examined cattle originating from *Bos taurus*, in the study conducted by Deb et al., 2014, *Bos indicus* crossbred cattle were examined. In this study where only Holstein cows were examined, unlike the other two studies, the relationship between these SNPs and subclinical mastitis was investigated and, no correlation was found between G22231T and 2 and subclinical mastitis. Similar to the results of this study, Asaf et al. (2015) reported that they did not find a relationship between G22231T and mastitis incidence in Vrindavani, a hybrid breed grown in India. On the other hand, in contrast to the results of this study in terms of the presence of the EE genotype in the C28300A, regions examined was different from the study by Yuan et al., (2012b). In this study, no relationship was found between G22231T and SNPs subclinical mastitis. However, it was observed that the AB genotype for the G22231T polymorphism and CC genotype for T25025A polymorphism was more common than the other genotypes among the group of subclinical mastitis containing 82 Holstein cows.

At the end of the study, it was concluded that increasing the number of samples may contribute to a more accurate explanation of the relationship between the *BRCA1* gene and mastitis. In addition, to investigate the relationship between C28300A coded SNP and subclinical mastitis, it was concluded that studies examining more samples should be planned to observe different genotypes.

References

- Asaf VM, Bhushan B, Panigrahi M, Dewangan P, Kumar A, Kumar P, Gaur GK, 2014a: Association study of genetic variants at single nucleotide polymorphism rs109231409 of mannose-binding lectins 1 gene with mastitis susceptibility in Vrindavani crossbred cattle. *Vet World*, 7 (10), 807-810.
- Asaf VM, Kumar A, Rahim A, Sebastian R, Mohan V, Dewangan P, Panigrahi M, 2014b: An overview on single nucleotide polymorphism studies in mastitis Research. *Vet World*, 7 (6), 416-421.

- Aytekin İ, Boztepe S, 2014: Süt sığırlarında somatik hücre sayısı, önemi ve etki eden faktörler. *TURJAF*, 2, 112-121.
- Bennewitz J, Reinsch N, Guiard V, Fritz S, Thomsen H, Looft C, Kuhn C, Schwerin M, Weimann C, Erhardt G, Reinhardt F, Reents R, Boichard D, Kalm E, 2004: Multiple quantitative trait loci mapping with cofactors and application of alternative variants of the false discovery rate in an enlarged granddaughter design. *Genetics*, 168,1019–1027.
- Biendima CC, Ramos SC, Uy MRD, Mingala CN, 2017: Molecular Characterization of BRCA1 as Candidate Gene Marker for Subclinical Mastitis in Dairy Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *PJS*, 146 (3), 293-298.
- Blöttner S, Heins BJ, Wensch-Dorendorf M, Hansen LB, Swalve HH, 2011: A Comparison between Purebred Holstein and Brown Swiss × Holstein Cows for Milk Production, Somatic Cell Score, Milking Speed, and Udder Measurements in The First 3 Lactations. *J Dairy Sci*, 94, 5212-5216.
- Chu MX, Ye SC, Qiao L, Wang JX, Feng T, Huang DW, Cao GL, Di R, Fang L, Chen GH 2012: Polymorphism of exon 2 of BoLA-DRB3 gene and its relationship with somatic cell score in Beijing Holstein cows. *Mol Biol Rep*, 39 (3), 2909-2914.
- Claridge J, Diggle P, McCann CM, Mulcahy G, Flynn R, McNai J, Williams DJ, 2012: Fasciola hepatica is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nat Commun*, 3, 853.
- Çoban Ö, Tüzemen N, 2007: Siyah Alaca ve Esmer ineklerde subklinik mastitis için risk faktörleri. *Uludağ Üniv J Fac Vet Med*, 26 (1-2), 27-31.
- Daetwyler HD, Schenkel FS, Sargolzaei M, Robinson JA, 2008: A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *J Dairy Sci*, 91, 3225–3236.
- Deb R, Singh U, Kumar S, Singh R, Sengar G, Sharma A, 2014: Profiling of bovine breast cancer 1, early onset (BRCA1) gene among Frieswal (HF× Sahiwal) cows and their association with mastitis. *Natl Acad Sci Lett*, 37 (6), 579-583.
- Egger-Danner C., Cole JB, Pryce JE, Gengler N, Heringstad B, Bradley A, Stock KF, 2015: Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal*, 9 (2), 191-207.
- Ensembl2020. https://aug2020.archive.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000022520;r=19:43069372-43139018, Access date: 01.08.2020.
- Francoz D, Wellemans V, Dupré JP, Roy JP, Labelle F, Lacasse P, Dufour S, 2017: Invited review: A systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 100 (10), 7751-7770.
- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC, 1994: Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*, 8 (4), 399.
- Fthenakis GC, 1995: California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Rumin Res*, 16 (3), 271-276.
- Gabrielli SS, Lasagno MC, Alencar TA, Ribeiro L, Dubenczuk FC, Oliva MS, Coelho SM, 2015: AmpC-lactamase production in Enterobacteria associated with bovine mastitis in Brazil. *Afr J Microbiol Res*, 9 (8), 503-508.
- Guerrero A, Dallas DC, Contreras S, Bhandari A, Cánovas A, Islas-Trejo A, Chee S, 2015: Peptidomic analysis of healthy and subclinically mastitic bovine milk. *Int Dairy J*, 46, 46-52.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H, 2007: Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q*, 29, 18–31.
- Heringstad B, Gianola D, Chang YM, Odegard J, Klemetsdal G, 2006: Genetic associations between clinical mastitis and somatic cell score in early first-lactation cows. *J Dairy Sci*, 89, 2236–2244.
- Jacob KK, Radhika G, Aravindakshan TV, 2018: An in-silico evaluation of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of mastitis resistance genes in cattle. *Anim*, 31 (1), 25-31.
- Janzen JJ: Economic losses resulting from mastitis. A review, 1970: *J Dairy Sci*, 53, 1151-1161.
- Krum SA, Womack JE, Lane TF, 2003: Bovine BRCA1 shows classic responses to genotoxic stress but low in vitro transcriptional activation activity. *Oncogene*, 22 (38), 6032.
- Kumar AA, Rahal SK, Dwivedi SK, Gupta MK, 2010: Bacterial prevalence and antibiotic resistance profile from bovine mastitis in Mathura, India. *Egypt. J Dairy Sci*, 38, 31-34.
- Rupp R, Hernandez A, Mallard BA, 2007: Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci*, 90 (2), 1029–1038.
- Saini V, McClure JT, Léger D, Keefe GP, Scholl DT, Morck DW, Barkema HW, 2012: Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*, 95 (8), 4319-4332.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, 1989: A Laboratory Manual Appendixes Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press City ?, Country ?.
- Tepeli SÖ, Zorba NN, 2017: Çanakkale (Yenice) ilinde üretilen çiğ sütlerin bazı özellikleri ve subklinik (gizli) mastitis görülme oranı. *Trakya Univ J Nat Sci*, 18 (1), 41-47.
- Tolone M, Mastrangelo S, Di Gerlando R, Suter AM, Monteleone G, Sardina MT, Portolano B, 2016: Association study between β -defensin gene polymorphisms and mastitis resistance in Valle del Belice dairy sheep breed. *Small Rumin Res*, 136, 18-21.
- Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene MI, 2000: BRCA1 and cell signaling. *Oncogene*, 19 (53), 6152-6158.
- Weigel KA, Shook GE, 2018: Genetic selection for mastitis resistance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 34 (3), 457-472.
- Yalçın M, Argun MŞ, 2017: Bitlis Eren Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu öğrencilerinin süt ve süt ürünleri

- tüketim alışkanlıklarının ve etkileyen faktörlerin belirlenmesi. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 6 (1), 51-60.
- Yaylak E, Akbaş Y, Özsoy AN, 2015: Siyah Alaca ile Bazı Süt Sığır Irkları Arasında Yapılan Melezlemeler ve Melez İneklerin Performansları. *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10 (1), 97-106.
- Youngerman SM, Saxton AM, Oliver SP, Pighetti GM, 2004: Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 87 (8), 2442–2448
- Yuan Z, Li J, Li J, Zhang L, Gao X, Gao HJ, Xu S, 2012a: Investigation on BRCA1 SNPs and its effects on mastitis in Chinese commercial cattle. *Gene*, 505 (1), 190-194.
- Yuan Z, Chu G, Dan Y, Li J, Zhang L, Gao X, Liu Z, 2012b: BRCA1: A new candidate gene for bovine mastitis and its association analysis between single nucleotide polymorphisms and milk somatic cell score. *Mol Biol Rep*, 39 (6), 6625-6631.
- *Correspondence:** Fadime DALDABAN
Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University, Kayseri, Turkey.
e-mail: ozdemir.fdm@gmail.com

Determination of Appropriate BHK-21 Cell Line to Obtain High Infective Titer and 146S FMD Virus Particles

Veli GÜLYAZ^{1,a,*}, Ahu Kader KARA^{2,b}, Neslihan TAŞÇENE^{2,c}, Banu Bayri ÖZBİLGE^{2,d}, Yasemin GÜLTEKİN^{2,e}, Mustafa HASÖKSÜZ^{3,f}, Gonca ÖZTAP^{4,g}

¹Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Harran University Şanlıurfa, Turkey,

²FMD (Şap) Institute, Çankaya, Ankara, Turkey.

³Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Istanbul University-Cerrahpaşa, Istanbul, Turkey

⁴General Directorate of Food and Control, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey

^aORCID: 0000-0003-0077-6077, ^bORCID: 0000-0002-9455-982X, ^cORCID: 0000-0003-2075-198X, ^dORCID: 0000-0002-9187-1543, ^eORCID: 0000-0002-5513-9611, ^fORCID: 0000-0003-3185-6453, ^gORCID: 0000-0003-2982-7055

Geliş Tarihi: 13.10.2020

Kabul Tarihi: 23.02.2021

Abstract: Foot and mouth disease (FMD) is one the most contagious diseases in cloven-hoofed animals and has a great potential for causing severe economic loss in susceptible animals. In the fight against FMD disease, inactive FMD vaccines are widely used. This study was carried out for the detection of suitable BHK-21 cell lines in order to get virus suspensions containing excess amounts of 146S FMD virus serotypes O, A and Asia-1, for FMD vaccine production. For this purpose, in addition to the BHK-21 An30 cell culture currently used in FMD vaccine production, BHK-21 An73 cell lines were passaged 20 times. In every 5 passages, infective titers and 146S virus particle quantities of FMD virus serotypes O, A and Asia-1 were measured. Additionally, karyotype analysis was performed on both cells at the 20th passage levels and the tests revealed that there was no significant change in the morphological features and chromosomal structures of the cells.

It was determined that the infective titer and 146S virus particle quantities of serotypes O, A and Asia-1 of FMD virus were very high in the BHK-21 An73 cell line than they are available in the BHK-21 An30 cell line. The increases of 146S virus particle quantities of serotypes O, A and Asia-1 of FMD virus were statistically significant ($p < 0.05$).

As a result, high titer FMD 146S virus particles can be obtained in the vaccine production process by pre-determining the BHK-21 cell lines that are most sensitive to the FMD virus. Due to the increase in vaccine production capacity, it was concluded that it would make an important economic contribution to the producer.

Keywords: BHK-21, cell line, FMDV, production, vaccine.

Yüksek İnfektif Titre ve 146S FMD Virus Partikülü Eldesi İçin Uygun BHK-21 Hücre Kültürü Hatlarının Saptanması

Özet: Şap Hastalığı (FMD), çift tırnaklı hayvanların en bulaşıcı hastalıklarından biri olup duyarlı hayvanlarda ciddi ekonomik kayba neden olma konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. FMD hastalığına karşı mücadelede inaktif FMD aşılı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma, FMD aşılı üretiminde fazla miktarda 146S FMD (O, A ve Asia-1) virüs partikülü içeren virüs süspansiyonu elde etmek için uygun BHK-21 hücre hatlarının tespiti amacıyla yapıldı. Bu amaçla şu anda FMD aşılı üretiminde kullanılan BHK-21 An30 hücre kültürüne ek olarak, BHK-21 An73 hücre hatları 20 kez pasajlandı. Her 5 pasajda bir, FMD virüsünün O, A ve Asia-1 serotiplerinin enfektif titresini ve 146S virüs partikül miktarları ölçüldü. Ayrıca, her iki hücre hattının 20. pasaj seviyelerinde karyotip analizi yapıldı ve hücrelerin morfolojik özelliklerinde ve kromozom yapılarında önemli bir değişiklik olmadığı saptandı. FMD virüsünün O, A ve Asia-1 serotiplerinin BHK-21 An73 hücre hattında elde edilen enfektif titre ve 146S virüs partikül miktarlarının, BHK-21 An30 hücre hattında saptanan değerlerden yüksek olduğu belirlendi. FMD virüsünün O, A ve Asia-1 serotiplerinin 146S virüs partikül miktarlarındaki artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Sonuç olarak, FMD virusuna karşı en duyarlı BHK-21 hücre hatlarının önceden belirlenmesi ile aşılı üretim prosesinde yüksek titrede FMD 146S virus partikülü elde edilebilecektir. Aşılı üretim kapasitesinin artmasından dolayı üreticiye ekonomik olarak önemli katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: BHK-21, hücre hattı, FMDV, , üretim, aşılı.

Introduction

Primary and permanent cell cultures are widely used in both laboratory studies, virus isolation and vaccine production studies (FMD, polio, rabies viruses, etc.). Especially in FMD virus isolation and vaccine production studies, BHK (baby hamster kidney) 21 cell lines are used mostly with other cell

cultures (Ali et al., 2013; Chapman and Stewart, 1962; Czelleng et al., 1987).

The BHK-21 cell production process can be generally divided into two. Namely, single layer cell cultures (monolayer) and suspended cell cultures. The BHK-21 cell is a fibroblast cell isolated from one

day old baby hamster's kidney cell by Mc Pherson and Stocker in 1961. BHK-21 C13 cell was obtained by cloning this cell. After Mowat and Chapman reported that the BHK-21 C13 cell was susceptible to foot and mouth disease in 1962, the suspended production process of this cell was developed in the same year (Barteling, 2002).

Foot and mouth disease (FMD) is caused by a virus of the genus *Aphthovirus*, family *Picornaviridae*. There are seven serotypes of FMD virus (FMDV), namely O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, and Asia 1, that infect cloven-hoofed animals (Callens and De cereq, 1997; OIE, 2017). Infection with any one serotype does not confer immunity against another. Within serotypes, many strains can be identified by biochemical and immunological tests of the domesticated species. Cattle, pigs, sheep, goats and water buffalo (*Bubalus bubalis*) are susceptible to FMD. Many species of cloven-hoofed wildlife may become infected, and the virus has occasionally been recovered from other species as well (Grubman and Baxt, 2004; OIE, 2017). The foot and mouth disease is included in the list of notifiable terrestrial and aquatic animal diseases listed by the International Committee and recommendations issued by the Regional Commissions instructed the OIE Headquarters as it has the potential to cause rapid and intensive spread within the country and across countries, and serious economic losses (OIE, 2017). There are multiple transmission routes, such as a wide host distribution of the foot and mouth disease, ability to infect with small doses, rapid replication rate, high level of viral expression and aerial spread. These features make foot and mouth disease a difficult and costly disease in terms of control and eradication. Countries free from the disease take major measures to prevent the entry of the virus. Therefore, foot and mouth disease imposes major restrictions on international trade of livestock and animal products (Alexandersen et al., 2003; Archetti et al., 1995; Nawaz et al., 2019). Vaccination takes an important place in the fight against FMD (Fransis et al., 1987; OIE, 2017). For this purpose, vaccination campaigns are organized in FMD-infected countries, and cattle and other susceptible animals are vaccinated. A large amount of vaccines are needed in the fight against FMD disease and FMD vaccines are produced in some countries (Rweyemamu et al., 1989; Xiao et al., 2016). After understanding that it is necessary to develop *in vitro* methods for large scale production of the FMD virus in the production of the vaccine, the advantages of monolayer and suspended cell lines have been noticed after the use of cattle tongue epithelial cells in the wide production of the virus, and pig kidney (PK) and BHK cell cultures started to

be used in its reproduction. Other cell cultures in which FMD virus is produced *in vitro* are primary cell cultures such as calf thyroid, calf testicle, calf kidney, lamb kidney, pig kidney and bovine tongue epithelium, Mengeling-Vaughn pig kidney line (IBRS), and hamster lung cell line called HmLu (Aktas and Samuel, 2000). Today, most of the foot and mouth disease vaccines are produced in laboratories with appropriate biosafety standards using BHK-21 cells produced as monolayer or suspended. In order to meet the amount of vaccine needed to be used against FMD, intensive production activities are carried out in vaccine production facilities (Çokçalışkan et al., 2016; Sareyyüpoğlu et al., 2019). BHK-21 cell clones used in vaccine production have an important effect in obtaining FMD vaccine virus with high titer, infective titer and 146S virus particles. 146S FMD virus particles in different titers are obtained from BHK-21 cell clones with the same cell number. Obtaining low levels of FMD 146S virus particles in each series of vaccine production depending on BHK-21 cell clones has a great impact on both the vaccine amount and the vaccine production cost.

This study conducted by us provides the high dose of FMD 146S virus particles needed by providing high levels of FMD 146S virus particles in the unit vaccine suspension required for the production of FMD vaccine for the use of BHK-21 An73 cell clones instead of BHK-21 An30, which is still used in routine FMD vaccine virus production. It was carried out in a short time and at low cost in order to obtain the required FMD vaccine dose.

Material and Methods

Penicillin (Applichem-A1837) and Streptomycin (Applichem-A1852): Antibiotics were sterilized by filtering through 0.22 µm porous filter after preparing 10.000 ppm stock solutions by dissolving with distilled water. Penicillin 100 IU/ml and Streptomycin 50 µg/ml were used in cell and virus cultures.

Cell cultures: BHK-21 An30 and BHK-21 An73 cell cultures were obtained from FMD (SAP) institute cell bank laboratory. The cells were propagated with Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) (Applichem-A-1321) containing inactivated fetal calf serum (FCS)(Biochrom) by adding 10%.

Viruses: FMD serotype A, O and Asia-1 viruses (A/NEP/84, O/TUR/07, Asia-1/TUR/11) were obtained from the FMD (SAP) institute virus bank laboratory.

Gum Tragacanth (Sigma 9000-65-1): Gum was used as a covering medium in determining infective titer. It was dissolved 1.3% in distilled water. After

autoclaving at 121°C for 20 minutes, it was mixed 50%+50% (v/v) with 2XGMEM medium.

Colchicine stock solution: ($2,5 \times 10^{-3}$ molar) 100mg colchicine + 100 ml PBS (pH 6.8, not containing calcium and magnesium) stir until dissolved.

Hypotonic solution: (0.56% KCl). Dissolve 0.56 gm of KCl in 100 ml of sterile distilled water, prepare it just before the use (pH 7.2 to 7.4).

Fixative: Three-part of methanol and 1 part of glacial acetic acid were mixed at the time of use and chilled properly at -20°C.

Giemsa stain solution: 1gr of Giemsa was dissolved in 66 ml of glycerol using mortar and pestle for 45 minutes. It was transferred into an aluminum foil wrapped flask and heated for 45 minutes to 1 hour. Later it was placed at room temperature for some time and 84ml of methanol

was added. Again it was placed for room temperature for some time and transfer to the dark amber bottle. The 5ml of stock solution of Giemsa was mixed with 45ml of distilled water before use.

Trypan blue solution (Biochrom, H350): 0.5% (w/v) was used as dye solution in cell counts.

Cell count: The Bürker chamber has 9 large squares (1 mm² each), divided by double lines (0.05 mm apart) into 16 group squares. The double lines form small 0.0025 mm² squares. The chamber depth is 0.1 mm. The cells were counted. Briefly, both operators take 10 µl of cell suspension with a micropipette and put them in the cell count chamber and then count the cells in each of the 4 large squares. At the end of the procedure the operators calculate the average of the 4 readings (from 4 large squares) and calculate the cell concentration as follows: (Gunetti et al., 2012).

$$\left[\frac{\text{Cell}}{\text{ml}} \right] = \left[\frac{\sum \text{cell counted 4 large squares}}{4} \right] \times (\text{dilution factor}) \times 1 \times 10^4$$

Preparation of BHK-21 An30 and An73 cell cultures. BHK-21 An30 and An73 cells were produced as a monolayer with GMEM containing 10% FCS in 25 cm² flasks at 4×10^5 cells/ml. After staining the cells with 10% trypan blue solution 2 days after each passage, live cell counts were performed and cell morphologies were examined for 20 days (With Bürker slide and Muse cell counting device). A, O and Asia-1 serotypes of FMD virus were cultivated in monolayer BHK-21 An30 and An73 cells, where morphological properties, reproductive kinetics, and chromosomal changes were examined in every 5 passages, and amounts of 146S virus particles FMD A, O and Asia-1 serotypes and their infective titers were determined (Van Wezej, 1967).

Karyotype analysis of BHK-21 An30 and BHK-21 An73 cell lines: In the karyogram study of BHK-21 An 30 and An 73 cell lines, chromosomes of a total of 50 metaphase plaques were examined at the level of passage 20. For this purpose, the media of BHK-21 An30 and BHK-21 An73 monolayer cell cultures produced in 25 cm² flasks at the 20th passage level were discarded, trypsinized and reconstituted to be $2-5 \times 10^4$ cells per ml /. 2 ml. Cells were added to the petri dishes containing 35 mm diameter coverslips. The petri dishes were incubated at 37 °C in a CO₂ incubator for 24 hours. At the end of the incubation period, the final concentration of freshly prepared colchicine stock solution was added to the monolayer cells in the coverslips at 4 °C and left for 4-6 hours incubation at 37 °C in a CO₂ incubator. The petri dishes were then removed from the incubator and their media was discarded. 1 ml from the hypotonic solution

(KCl at 0.075 M, 37 °C) was added dropwise onto the coverslips in the petri dishes by pipette and incubated for 30 minutes at 37 °C in an incubator with CO₂. At the end of the period, 2 ml of cold cornoy's fixative solution was added dropwise to the coverslips without removing the hypotonic solution. Plates were kept at room temperature for 10 minutes. At the end of the period, fixative and hypotonic solutions were aspirated from petri dishes. Coverslips were removed with the aid of a forceps and the cells were stained for 10-20 minutes by adding giemsa dye to the working solution. The stained coverslips were carefully washed 3 times with tap water and dried at room temperature. Cells on coverslips were examined with an immersion lens (100X lens) under a light microscope. (Freshney, 2010).

Detection of FMD 146S virus particles and infective titers 146S virus particles: The determination of the 146S virus particle amount was done by the SDG (Sucrose Density Gradient) method in FMD (SAP) Institute Protocol (2010). With the help of the gradient maker, a linear gradient was obtained in the ultracentrifuge tube by layering sucrose concentrations starting with 45% sucrose at the bottom and 15% sucrose at the top. 0.5 ml of virus sample was added slowly over the gradients and the tubes were placed in the ultracentrifuge godet. Godet was placed in the rotor and centrifuged at 41.000 rpm for 2 hours at +4°C temperature in a vacuum condition. At the end of the centrifuge, to ensure that the samples pass through a computer-connected UV detector (254 nm), the device was started to be dispensed from the bottom of the tube and at a suitable flow rate

of 60% sucrose base. When the sample started to pass through the detector, the appropriate absorbance width was set and the computer program (Chroma Simple) was started. After the peak occurred in the program, the starting and ending points of the peak are drawn; the program automatically calculated the amount of 146S particles ($\mu\text{g/ml}$) measured as the area of the peak (Özbilge et al., 2020; Shirai et al., 1990).

Plaque test (Infective titer): Monolayer BHK-21 An30 and An73 cells were prepared in 6-well plates 48 hours before the test. $100 \mu\text{l}$ 10^{-1} to 10^{-6} dilution of the virus inoculated to the cells. The plates were allowed to adsorb at 37°C in a 5% CO_2 incubator for 1 hour, and 3ml medium (50% Gum + 50% GMEM 2X) was added to each well at the end of this period. Plates were incubated again for 48 hours at 37°C and 5% CO_2 incubator. At the end of the period, 2ml staining solution prepared with crystal violet was added to each well after discarding the media. Finally, the dye was discarded and the plates were washed with tap water. In the evaluation, the last dilution in which plaques were counted was read and infectious titer pfu / ml was calculated (Baer and Kehn-Hall, 2014; Berg et al., 1963).

Statistical Analysis: All data were analyzed with Shapiro-Wilk and Levene Statistical tests. According to these two statistical results, independent samples t-Test was performed to detect the differences in amounts of FMD 146 S virus particles and infective titers of FMD virus that reproduced in BHK-21 An30 and An73 cell cultures at the 5, 10, 15, and 20th passage levels. The statistical results were evaluated on the 95% confidence interval. For the statistical analyses SPSS 22.0 (Inc., Chicago II, USA) software was used.

Ethics committee approval is not required for this article

Results

Karyotype properties of BHK-21 An30 and An73 cell cultures: In the karyogram study of BHK-21 An30 cell with $2n: 44$ chromosome number, at the end of the 20th passage, the total number of 50 metaphase (MF) plates examined in the chromosome number 41 (2 MF), 42 (1 MF), 43 (1 MF), 44 (While 31 MF) is detected as 45 (6 MF) and 46 (at 3 MF), the BHK-21 An73 cell has the following number of chromosomes in 50 metaphase plates, 40 (at 3 MF), 41 (1 MF), 43 (1 MF), 44 (29 MF), 45 (4 MF), 46 (2 MF) 47 (3 MF) and 49 (1 MF)(see Figure 1,2,3,4).

Amount of FMD 146S virus particles: Following the propagation of FMD virus serotypes A, O and Asia-1 on BHK 21 An30 and An73 cell

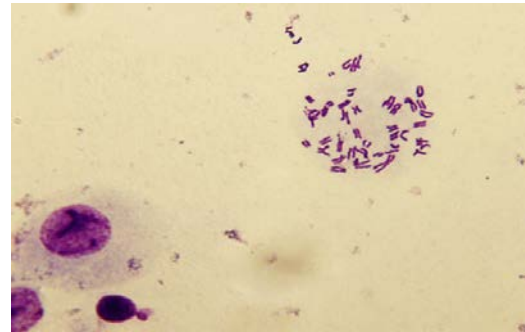


Figure 1. Karyotype of BHK-21 An30 monolayer cells.

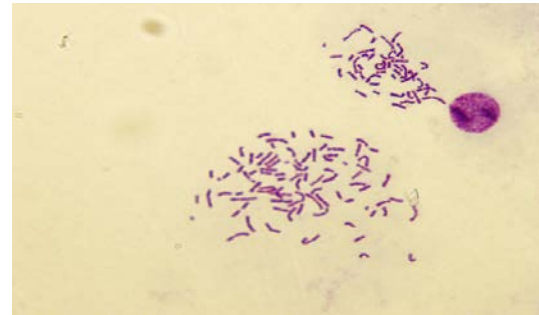


Figure 2. Karyotype of BHK-21 An73 monolayer cells

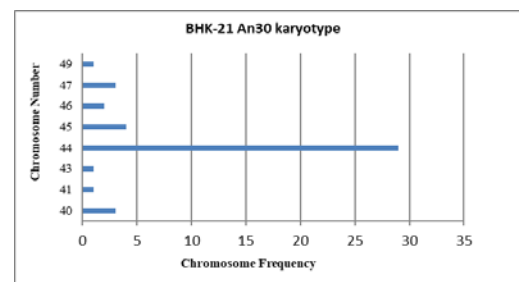


Figure 3. Chromosome of BHK-21 An30 cell line

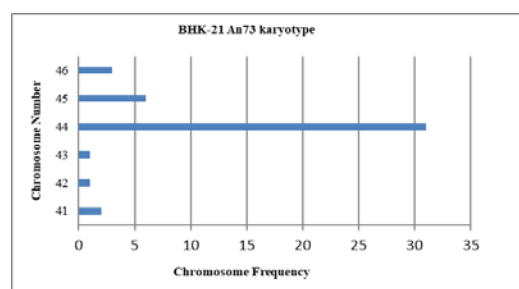


Figure 4. Chromosome of BHK-21 An73 cell line

cultures at the 5, 10, 15, and 20th passage levels, the amount of mean FMD 146S virus particles was observed as 0.48, 0.37, 0.29, 0.53, and 1.58, 1.72, 1.69, 1.68 $\mu\text{g/ml}$ for A/NEP/84; 1.59, 1.75, 0.96, 0.80, and 2.59, 2.12, 2.83, 2.37 $\mu\text{g/ml}$ for O/TUR/07; 0.44, 0.48, 0.81, 0.75, and 1.38, 0.89, 2.01 ve 2.08 for Asia-1/TUR/11 produced in the BHK 21 An30 and An73 cell cultures respectively (see Figure 5, 6, 7), (see Table 1).

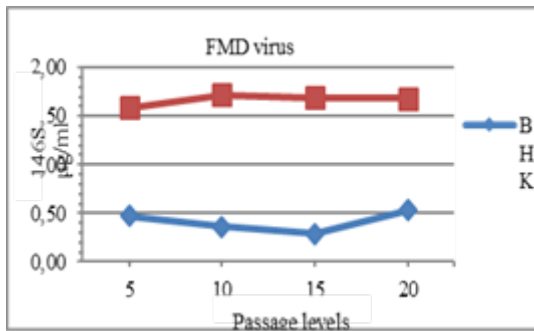


Figure 5: Comparison of 146S virus particle of the FMDV serotype A/NEP/84

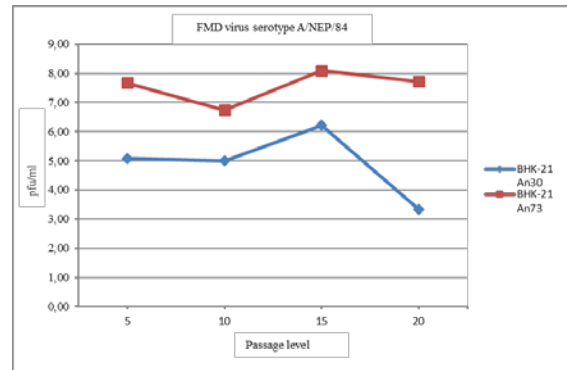


Figure 8: Comparison of infective titer of FMD serotype A/NEP/84

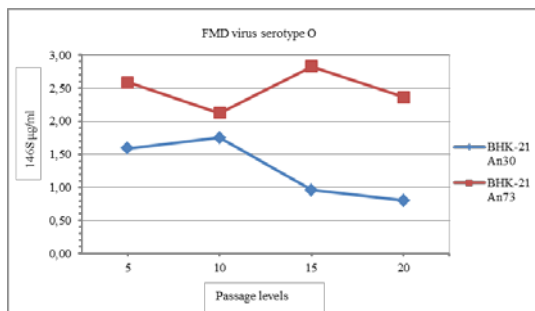


Figure 6: Comparison of 146S particle of the FMDV serotype O/TUR /07

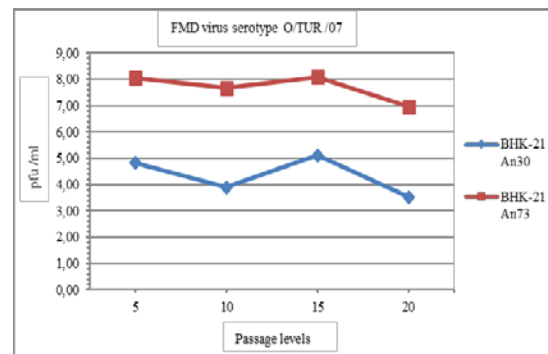


Figure 9: Comparison of infective titer of FMD serotype O/TUR /07

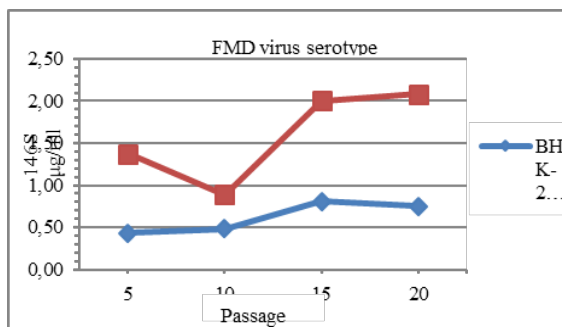


Figure 7: Comparison of 146S particle of FMDV serotype Asia-1/TUR/11

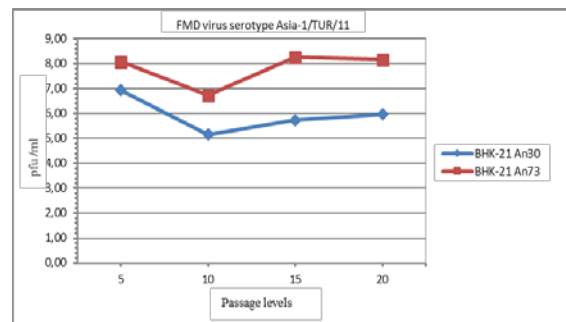


Figure 10: Comparison of infective titer of FMD serotype Asia-1/TUR/11

FMD infective virus titers on BHK 21 An30 and An73 cell cultures: The mean infective titers of FMD virus for serotype A/NEP/84, O/TUR /07 and Asia-1/TUR/11 produced at the 5, 10, 15, and 20th passage level of BHK 21 An30 cell culture were determined to be $10^{5.08}$, $10^{5.08}$, $10^{6.20}$, $10^{2.30}$, $10^{4.82}$, $10^{4.82}$, $10^{5.10}$, $10^{3.50}$ and $10^{6.94}$, $10^{5.10}$, $10^{5.70}$, $10^{5.90}$ pfu/ml respectively (see Table 2). Infective titers of FMD serotype A/NEP/84, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/11 viruses produced in BHK 21 An73 cell cultures at 5, 10, 15 and 20th passage levels, were determined as $10^{7.67}$, $10^{6.70}$, $10^{8.00}$, $10^{7.70}$ (for A strain); $10^{8.07}$, $10^{7.60}$, $10^{8.00}$, $10^{6.90}$ (for O strain) and $10^{8.07}$, $10^{6.70}$, $10^{8.00}$, $10^{8.10}$ (for Asia-1) pfu/ml respectively (see Figure 8, 9, 10) (see Table 2).

Statistical Analysis: 146S values of all three serotypes pertaining to FMD viruses were shown to be higher in BHK-21 An73 cell cultures compared to BHK An30 cell cultures, and these increases were statistically significant ($p < 0.05$) (see Table 1).

In comparison to infected titers of all three serotypes, A/NEP/84, O/TUR/07 and Asia-TUR /11 of FMD viruses in 5, 10, 15 and 20th passages in terms of BHK-21 An 30 and An73 cell cultures; an increase was found in infective titers in BHK-21 An73 cell culture compared to BHK-21 An 30, and these increases are statistically significant ($p < 0.05$).

Table 1. The comparison of amounts of FMD 146S virus particles produced in BHK-21 An30 and An73 cell cultures

Cell Cultures	Passage Level	Amounts of FMD 146 S virus particles ($\mu\text{g/ml}$)											
		A/NEP/84				O/TUR/07				Asia-TUR/11			
		Mean Value (X)	SX	SEM	P value	Mean Value (X)	SX	SEM	P value	Mean Value (X)	SX	SEM	P value
BHK-21 An30	5	0,48	0,14	0,05	0,001	1,59	0,15	0,05	0,001	0,44	0,05	0,02	0,001
BHK-21 An73	5	1,58	0,04	0,01		2,59	0,11	0,04		1,38	0,09	0,03	
BHK-21 An30	10	0,37	0,09	0,03	0,001	1,75	0,09	0,03	0,004	0,48	0,12	0,04	0,001
BHK-21 An73	10	1,72	0,1	0,03		2,12	0,25	0,09		0,89	0,12	0,04	
BHK-21 An30	15	0,29	0,08	0,03	0,001	0,96	0,11	0,04	0,001	0,81	0,13	0,05	0,001
BHK-21 An73	15	1,69	0,15	0,05		2,83	0,16	0,06		2,01	0,09	0,03	
BHK-21 An30	20	0,53	0,11	0,04	0,001	0,80	0,08	0,03	0,001	0,75	0,16	0,06	0,001
BHK-21 An73	20	1,68	0,17	0,06		2,37	0,12	0,04		2,08	0,12	0,04	

Table 2. The comparison of FMD infective virus titers on BHK-21 An30 and An73 cell cultures

Cell Cultures	Passage Level	FMD infective virus titers (pfu/ml)											
		A/NEP/84				O/Tur/07				Asia-TUR/11			
		Mean Value (X)	SX	SEM	P value	Mean Value (X)	SX	SEM	P value	Mean Value (X)	SX	SEM	P value
BHK-21 An30	5	5,08	0,54	0,20	0,001	4,82	0,98	0,37	0,001	6,94	0,12	0,05	0,001
BHK-21 An73	5	7,67	0,61	0,23		8,07	0,45	0,17		8,07	0,42	0,16	
BHK-21 An30	10	5,08	0,17	0,06	0,001	4,82	0,21	0,08	0,001	5,10	0,15	0,06	0,003
BHK-21 An73	10	6,70	0,84	0,31		7,60	0,25	0,09		6,70	1,14	0,43	
BHK-21 An30	15	6,20	0,96	0,36	0,001	5,10	1,49	0,56	0,001	5,70	1,38	0,52	0,002
BHK-21 An73	15	8,00	0,49	0,18		8,00	0,49	0,18		8,00	0,69	0,26	
BHK-21 An30	20	2,30	0,48	0,18	0,001	3,5	0,52	0,20	0,001	5,90	0,96	0,36	0,001
BHK-21 An73	20	7,70	0,73	0,27		6,9	0,80	0,30		8,10	0,69	0,26	

Numerically, the highest infective titer increase in BHK-21 An 30 and An73 cell culture was found in the 15th passage for FMD A/NEP/84, O/TUR/07, and it was observed to decrease in the 20th passage. For the Asia-TUR/11 serotype, the highest infective titer increase was obtained in the 5th passage for BHK-21 An 30 in the 20th passage for BHK-21 An73.

In general, it was concluded that the infective titer tends to decrease after the 15th passage for FMD A/NEP/84, O/TUR/07 in BHK-21 An 30 and An73 cell culture.

According to these results, it was concluded that BHK-21 An73 cell culture and BHK-21 An30 cell culture compared to 146S values in the same passage number of FMD vaccine serotypes and

infective titer values were more positive ($p < 0.05$) than BHK-21 An30 in BHK-21 An73 cell culture.

Discussion and Conclusion

Suspended and monolayer-style BHK-21 cell cultures are widely used in both isolation of FMD virus and in the production of foot and mouth disease vaccine against FMD disease. Different cell clones were obtained in cloning studies in BHK-21 cell cultures. These BHK-21 clone cells obtained are used under different names and in different laboratories. (Abbas et al., 2011; Ali et al., 2013; Czellige et al., 1987).

Both BHK-21 An30 and BHK-21 An31 cell lines of BHK-21 cells pertaining to different clones are

used in FMD virus isolation or vaccines production processes in Turkey. These two clones are still in use (Abbas et al., 2011, Harmsen et al., 2011, Jerome and Howard, 1964, Rahman et al., 2007, Shirai et al., 1990), provided by the Brescia Institute in Italy. This project was carried out to demonstrate the usability of cells called BHK-21 An73 in order to obtain high efficiency virus both in isolation of foot and mouth virus isolation and in the production of foot and mouth vaccine by passaging in the institute. In the production of vaccines used in the fight against FMD disease, the dose amount to be given to each animal is determined according to the 146S virus particles obtained in milligrams after production (Bartelling, 1991; OIE, 2017). In this study, when comparing monolayer BHK-21 An30 and An73 cell cultures, 146S virus particles in BHK-21 An73 of A, O and Asia-1 foot and mouth vaccine strains cell cultures were much higher than BHK An30 cell cultures, with 146S value in both cell cultures, in the 15th passage it made a peak, it was approximately 6 times higher for A type, 3 times higher for O type and 2.5 times higher for Asia-1, and that the infective titers were high in BHK-21 An73 cell culture therefore BHK-21 An73 cell A, O and Asia-1 vaccine has proven to be more suitable for the production of seed viruses.

In studies for determining the reproductive characteristics of FMD virus in different BHK-21 cell culture lines in different laboratories, infective titers of FMD virus have been reported to be $10^{4.5}$ to $10^{8.3}$ log₁₀ and 146S virus particle amount is 0.44 µg/ml (Abbas et al., 2011; Czelleng et al., 1987). In this study, virus infective titers obtained from BHK-21 An73 cell cultures were close to the values obtained in other studies (Abbas et al., 2011; Ali et al, 2013), while other infectious virus particles obtained in BHK-21 An73 cell cultures are higher with respect to other studies, it is thought that these high rates are created due to deviation from BHK-21 cell clones used in other studies.

The morphological structural changes were determined in the monolayer both BHK-21 An30 and An73 cell cultures after 17 passage levels in the 20-day passaging period and 146S measurements and infective titers decreased. Czelleng et al. (1987), reported that chromosome numbers of BHK cell lines were found to be 42 for AC-9 and Tubingen and Torino BHK-21 cell lines; 46 for Razi II and 82 for Brescia-derived BHK-21 cells, and there was a correlation between the chromosome numbers in BHK-21 cells and FMD virus titers produced in these cells. In this study conducted by us, with respect to the karyotype analysis performed at the end of every 5 passages, peak chromosome numbers found in BHK-21 An30 and An73 cell lines (n=44) were determined to be quite close to results

reported by other study regarding chromosome numbers found in BHK-21 Tubingen and Torino (n=42) and AC-9 and Razi II (n=46) cell lines (Czelleng et al. 1987). However, in these studies, it was found that chromosomal numbers did not change significantly in BHK-21 An30 and AN73 cell lines after 15th passage although cell aging and morphological changes occur.

Consequently; BHK-21 An73 cell cultures, which will be used both in isolation of foot and mouth disease virus and in the production of foot and mouth disease vaccine, should be selected before use, and BHK-21 An73 cell culture used in this study should be selected both in terms of cost in vaccination production and in the increase of annual vaccine dose amount. It was concluded that it is more suitable than cell culture and that the number of cell passages should not exceed 20 passages during production.

Acknowledgement

This project was supported by the Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies (TAGEM/HSGYAD/16/A02/P02/78). We thank Şükran Yılmaz, Ayşegül Kudu, Ayşenur Ulusoy for their contribution in this study

Disclosure

Author Contributions: VG and AKK designed the experiments, AKK, VG, BBÖ, NT and YG carried out the experiments, VG, MH and GÖ analysed the data and wrote the paper.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Animal and Human Rights Statement: This study was conducted under the supervision of the General Directorate of Agricultural Research and Policies of the Ministry of Agriculture and Forestry. In addition, ethical committee permission was not obtained due to lack of study on experimental animals.

References

- Abbas F, Khan FA, Ahmad F, Hussain A, Ahmad M et al, 2011: Production of foot and mouth disease virus vaccine (O Type) on BHK-21. cell line, *Iğdır Univ J Ins Sci Tech*, 1(2), 155-159.
- Aktas S, Samuel AR, 2000: Identification of antigenic epitopes on the foot and mouth disease virus isolate O1/Manisa/Turkey/1969 using monoclonal antibodies. *Rev Sci Tech*, 19, 744-753.
- Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM. 2003: The pathogenesis and diagnosis of foot and mouth disease. *J Comp Path*, 129, 1-36.

- Ali SM, Ismail AH, Soliman EM, Hanaa AM, 2013: Studies on growth kinetics of the FMDV serotype SAT-2 Egyptian strain in cell culture. *J Vet Adv*, 3(2), 92-97.
- Archetti I, Amadori M, Donn A, Salt J, Lodetti E, 1995: Detection of foot-and-mouth disease virus-infected cattle by assessment of antibody response in oropharyngeal fluids. *J Clin Microbiol*, 33(1), 79-84.
- Baer A, Kehn-Hall K, 2014: Viral concentration determination through plaque assays. *J Vis Exp*, 93, 1-10.
- Bartelling SJ, 2002: Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 21, 577-588.
- Bartelling SJ, Vreeswijk J, 1991: Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9(2), 5-88.
- Berg K, Mohr J, 1963: Genetics of the Lp system. *Acta Genet*, 13(4), 349-360.
- Callens M, De Clercq K, 1997: Differentiation of the seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 67, 35-44.
- Chapman WG, Stewart DL, 1962: Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*. 195, 1163.
- Czelleng F, Zsitvay K, Egyhazi ZS, Baranyi M, Fazekas A, 1987: Comparative analysis of BHK-21 cell lines of virus strains of foot-and-mouth disease. *Arch Exper Vet Med*, 41(6), 701-796.
- Çokçalışkan C, Türkoğlu T, Sareyyüpoğlu B, Uzunlu E, Babak A., et al, 2016: Qs-21 enhances the early antibody response to oil adjuvant foot and mouth disease vaccine in cattle. *Clin Exp Vac Res*, 5,138-147.
- Fransis BMJ, Fry CM, Rowlands DJ, Brown F, Bitte JL et al, 1987: Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease. *Immunology*, 61(1), 1-6.
- Freshney RI, 2010: A manual of basic technique and specialized application. Wiley-Blackwell, A John Wiley&Sons, Inc. Pub.
- Grubman MJ, Baxt B, 2004: Foot and mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 17(2), 465-493.
- Gunetti M, Castiglia S, Rustichelli D, Mareschi K, Sanavio F et al, 2012: Validation of analytical methods in GMP: the disposable fast read 102W device, an alternative practical approach for cell counting. *J Trans Med*, 31,10-112.
- Harmsen MM, Fitjen HPD, Westra DF, Coco-Martin JM, 2011: Effect of thiomersal on dissociation of intact (146s) foot-and-mouth disease virions into 12s particles as assessed by novel elisas specific for either 146s or 12s particles. *Vaccine*, 29, 2682-2690.
- Jerome P, Howard LB, 1964: Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *J Appl Microbiol*, 12 (4), 368-373.
- Nawaz Z, Siddique AB, Zahoor MA, Bilal Aslam, B, Zahoor MK et al, 2019: Detection of foot and mouth disease virus shedding in milk of apparently healthy buffaloes and cattle of Punjab, Pakistan. *Buffalo Bull*, 38(2), 255-261.
- OIE, 2017: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Terrestrial Manual: foot and mouth disease: Chapter 3.1.8, (May), 433-464.
- Özbilge BB., Gülyaz V, Taşçene N, Yılmaz Ş, Gültekin Y et al, 2020. Determination of the effects of enrofloxacin, linco-spectinand florfenicol antibiotics on BHK-21 cell culture and FMD 146s virus particles-infective titers. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 31(1), 7-19.
- Paton DJ, Taylor G, 2011: Developing vaccines against foot-and-mouth disease and some other exotic viral diseases of livestock. *Phil Trans R Soc B*, 366(1579), 2774–2781.
- Rahman SU, Rabbani M, Sahidullah K, Muhammed Z, 2007: Studies on in vitro culture characteristics of adherent baby hamster kidney-21(BHK-21) cell line. *Int J Agri Biol*, 9(6), 821-826.
- Rweyemamu MM, Umehara O, Giorci W, Medeiros R, Lucca DN et al, 1989: Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 8(3), 747-764.
- Sareyyüpoğlu B, Gülyaz V, Cokçalışkan C, Ünal Y, Çökülgen T, et al, 2019: Effect of fmd vaccination schedule of dams on the level and duration of maternally derived antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*, Vol, 217.
- Shirai J, Chatchawanchonteera A, Sinsuwongwat W, Makarasen P, Sugimura T, 1990: Estimation of 146s particles in foot and mouth disease virus (FMDV) vaccine by using computer analysing system. *Jpn J Vet Sci*, 52(3), 621-630.
- Xiao Y, Chen HY, Wang Y, Yin B, Lv C et al, 2016: Large-scale production of foot-and-mouth disease virus (serotype Asia-1) VLP vaccine in escherichia coli and protection potency evaluation in cattle. *BMC Biotechnology*, 16: 56.
- Van Wezel AL, 1967: Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*, 216; 64.

*Correspondence: Veli GÜLYAZ

Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Sanliurfa, Turkey.

e-mail: veli.gulyaz@harran.edu.tr

Kedi ve Köpeklerde Koksofemoral Eklem Çıkıklarının Tedavisinde Modifiye Toggle Pin Tekniğinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

Ziya YURTAL^{1,a,*}, Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ^{1,b}, Muhammed Enes ALTUĞ^{1,c}, İbrahim ALAKUŞ^{1,d}, Halil ALAKUŞ^{1,e}, Cafer Tayer İŞLER^{1,f}

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

^aORCID: 0000-0001-6080-1860, ^bORCID: 0000-0002-9532-247X, ^cORCID: 0000-0003-3896-9944, ^dORCID: 0000-0002-2031-7035, ^eORCID: 0000-0001-9265-2310, ^fORCID: 0000-0002-1910-8316

Geliş Tarihi: 02.11.2020

Kabul Tarihi: 11.01.2021

Özet: Bu klinik retrospektif çalışmada, koksofemoral çıkık şekillenen kedi ve köpeklerde modifiye toggle pin tekniğinin kullanımı ve sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışma materyalini 13 kedi, 20 köpek olmak üzere toplam 33 vaka oluşturdu. Kedilerin ortalama ağırlığı 3.2 kg, köpeklerin ortalama ağırlığı 18.0 kg idi. Koksofemoral çıkığın tespiti için radyografik ve klinik muayeneler yapıldı. Asetabular stabilizasyon için modifiye toggle aparatı olarak kirschner telinden hazırlanan farklı ebatlarda modifiye toggle pinler kullanıldı. Monofilament suture materyali olarak balıkçı misinası kullanıldı. Lateral stabilizasyon için trochanter mayore açılan transvers delik, kirschner telinden hazırlanan pin ve rondela kullanımı olmak üzere 3 farklı uygulama yapıldı. Kullanılan teknikten bağımsız olarak, 13 kedinin 12'sinde herhangi bir komplikasyon şekillenmedi ve sonuç %92 başarı ile mükemmel olarak kaydedildi. Bir vakada ise yeniden travmaya maruz kalması sonucu reluksasyon şekillendi (%8). Köpeklerde 10 vakada herhangi bir komplikasyon şekillenmedi (%50), 2 vakada yeniden travmaya maruz kalması sonucu reluksasyon şekillendi (%10), 8 vakada ise sublüksasyon görüldü (%40). Sublüksasyon şekillenme nedeni operasyon öncesi kalça eklemine başka patolojilerin varlığına bağlandı. Sonuç olarak; koksofemoral çıkıklarda kedilerde modifiye toggle pin tekniği başarılı bir şekilde kullanılırken, köpeklerde bu başarının kedilere nazaran daha düşük olduğu görüldü. Uygulanan tekniğe bakılmaksızın, köpeklerin kedilerden hacim ve ağırlık olarak daha büyük olması başarı oranını azaltmıştır. Operasyon yapılacak vakaların doğru seçilmesinin sonuca önemli derece etki edebileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kedi, Koksofemoral eklem çıkığı, Köpek, Modifiye toggle pin.

Retrospective Evaluation of Modified Toggle Pin Technique in the Treatment of Coxofemoral Joint Luxations in Cats and Dogs

Abstract: The aim of this clinical retrospective study was to evaluate the use and results of the modified toggle pin technique in dogs and cats with coxofemoral luxation. A total of 33 cases, 13 cats and 20 dogs, comprised the study material. The average weight of cats and dogs was 3.2 kg and 18.0 kg, respectively. Radiographic and clinical examinations were performed for the diagnosis of coxofemoral luxation. For acetabular stabilization, pins of different sizes prepared from kirschner wire were used as a modified toggle apparatus. Fishing line was used as monofilament suture material. Three different methods were used for lateral stabilization: a transverse hole opened in a greater trochanter, a washer, and a modified pin prepared from kirschner wire. Regardless of the technique used, 12 of the 13 cats did not develop any complications and the result was excellent with 92% success rate. In one case, reluxation occurred due to re-trauma (8%). In dogs, no complications occurred in ten cases (50%), reluxation occurred in two cases as a result of re-trauma (10%), sublaxation was observed in eight cases (40%). The reason for sublaxation was attributed to the presence of other pathologies in the hip joint before the operation. As a result, while the modified toggle pin technique was used successfully in cats in coxofemoral dislocations, it was observed that this success was lower in dogs than in cats. Regardless of the technique applied, dogs being larger in volume and weight than cats reduces the success rate. It has been shown that the correct selection of the cases to be operated can significantly affect the result.

Keywords: Cat, Coxofemoral joint luxation, Dog, Modified toggle pin.

Giriş

Kaput femoris'in, ligamentum kapitis ossis femorisin kopması sonucu asetabulum'dan ayrılarak yer değiştirmesi, koksofemoral çıkık olarak tanımlanır (Altuğ ve ark., 2019). Koksofemoral çıkıklar, küçük hayvanlarda sık görülen bir yaralanma olup tüm eklem çıkıklarının köpeklerde %90'ını, kedilerde ise %73'ünü oluşturur (Basher ve ark., 1986; Ergin ve

ark., 2016; Jha ve Kowaleski, 2012; Pratesi ve ark., 2012). Çıkıkların etiyolojisini motorlu taşıt kazaları başta olmak üzere, iyatrojenik durumlar, spontane çıkıklar, hayvan kavgaları ve yüksekte düşmeler oluşturur (Ergin ve ark., 2016; Trostel ve Fox, 2020). Çıkıklar, gluteal ve iliopsoas kaslarının çekmesi ile oluşturulan kuvvetlerin bir sonucu olarak en sık

kraniodorsal yönde oluşur (Kieves ve ark., 2014; Trostel ve Fox, 2020). Kranioventral, kaudoventral (%1.5-3.2) ve kaudodorsal yönlerde çıkık oluşma sıklığı çok azdır (Kieves ve ark., 2014). Koksofemoral çıkıklar kapalı veya açık tekniklerle tedavi edilebilir (Jha ve Kowaleski, 2012; Trostel ve Fox, 2020). Koksofemoral çıkıklarda, kapalı redüksiyon kalça displazisi ya da diğer ortopedik problemlere ilişkin radyografik bir bulgu olmadığında denenebilir (Kieves ve ark., 2014; Pratesi ve ark., 2012). Ancak köpeklerde ve kedilerde bildirilen başarı oranları kraniodorsal çıkıklarda %50 ile %78 arasında değişmektedir (Pratesi ve ark., 2012; Trostel ve Fox, 2020). Redüksiyon işleminden sonra ise yeniden çıkmasını önlemek amacıyla 10-14 gün kadar Ehmer askısı önerilmiştir (Kieves ve ark., 2014; Pratesi ve ark., 2012).

Kapalı redüksiyon başarısız olduğunda kalçanın açık redüksiyonu ve stabilizasyonu için kapsülorafı, DeVita pinleme, ekstrakapsüller sütürlerin yerleştirilmesi, gluteus profundus kasının tenodezi, transartiküler pinleme, femurun trochanter majorunun transpozisyonu, sakrotuberöz ligamentin transpozisyonu ve Toggle pin stabilizasyonu dahil olmak üzere çok sayıda teknik tarif edilmiştir (Çetinkaya ve Olcay, 2010; Kieves ve ark., 2014; Pratesi ve ark., 2012;).

Toggle pin stabilizasyonu tarihte ilk kez 1953 yılında Knowles tarafından tanımlanmıştır (Knowles ve ark., 1953). Bu teknikte kopmuş olan ligamentum kapitis ossis femoris'in yerine fascia lata'dan oluşturulan bir şerit yerleştirilmiştir (Ergin ve ark., 2016). Toggle pin stabilizasyonunda amaç, femur başının ligamenti yerine geçecek sentetik bir protez kullanılarak koksofemoral eklem redüksiyonunu sağlamak ve eklem kapsülünün iyileşmesine ve skar dokusunun oluşmasına izin vermektir. Prosedür, emilebilir ve emilemeyen sütür materyali dahil olmak üzere ligamentum kapitis ossis femoris olarak işlev gören birçok protez varyasyonu kullanılarak tanımlanmıştır (Kieves ve ark., 2014).

Toggle pin stabilizasyonu, kalça eklemine ameliyat sonrası hareketsizleştirilmesini gerektirmeyen, daha "fizyolojik" bir onarım aracı olarak savunulmaktadır (Jha ve Kowaleski, 2012). Reluksasyon oranı düşüktür ve özellikle çoklu ortopedik yaralanmaları olan hastalarda bacağı erken yüklenilmesini sağladığı için faydalıdır (Jha ve Kowaleski, 2012; Trostel ve Fox, 2020). Femur başı ve boyunun eksizyon artroplastisi ve total kalça protezi, diğer teknikler başarısız olduğunda kurtarma prosedürleri olarak kullanılabilir (Off ve Matis, 2010; Pratesi ve ark., 2012).

Bu çalışmanın amacı, koksofemoral çıkıkların tedavisinde toggle pinlerin kullanıldığı vakalarda, sonuçların geriye dönük olarak yeniden değerlendirilmesidir.

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini 2015-2020 yılları arasında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Sağlık, Uygulama ve Araştırma Hastanesi'ne yüksekten düşme, trafik kazası ve topallık şikayetleri ile getirilen ve radyografik muayenede koksofemoral çıkık tanısı konulan farklı ırk, yaş, ağırlık ve cinsiyetteki 13 kedi ve 20 köpek olmak üzere toplam 33 vaka oluşturdu.

Çalışma, klinik retrospektif bir çalışma olduğu için etik kurul onayı gerekmemektedir.

Vakalar ile ilgili bilgiler Tablo 1 ve Tablo 2'de sunulmuştur.

Anestezi Prosedürü: Operasyondan 30 dakika önce nonsteroid antiinflamatuvar olarak kedilerde 15 mg/kg IV, köpeklerde ise 25 mg/kg IV metamizol sodyum (Geralgine-GÖ, Münir Şahin) uygulandı. Genel anestezi indüksiyonu için 2 mg/kg IM ksilazin (Alfazyne®, Egevet 20 mg/ml) ve kedilerde 10 mg/kg, köpeklerde 15 mg/kg IM ketamin HCl (Alfamine®, Egevet 100 mg/ml) kullanıldı. Anestezi indüksiyonu sağlandıktan sonra hasta kaflı bir endotrakeal tüp vasıtası ile entübe edildi ve %100 O₂ içerisinde izofluran (%1-3 inhalasyon, Forane, AbbVie, İngiltere) ile anestezi devamlılığı sağlandı.

Cerrahi Prosedür: Operasyondan önce 0,6 mm-1,2 mm çaplı Kirschner telleri ile modifiye toggle pinleri bir pin bükücü yardımıyla uygun büyüklükte hazırlandı ve sterilizasyonu sağlandı (Şekil 1). Hastalar, opere edilecek bacakları yukarıda kalacak şekilde, lateral pozisyonda ameliyat masasına yerleştirildi. Bacağın önde ilium kanatlarının proksimaline, arkada kuyruk köküne ve alt tarafta ise tibianın diafizine kadar geniş bir alanda tıraşı yapılarak, asepsi-antisepsi kurallarına göre bölge hazırlandı. Steril serviyetler ile ameliyat bölgesi sınırlandırıldıktan sonra koksofemoral eklemi açığa çıkarmak için kranioyateral ensizyon uygulandı (Şekil 2a). Musculus gluteus medius ve musculus gluteus profundus kası ekarte edildikten sonra asetabulumun kranial yüzüne ulaşıldı. Asetabular kavite palpasyon ile muayene edilerek eklem yüzeyindeki üremeler değerlendirildi. Eklem içinde bulunan kan pıhtıları ve ligament kalıntıları temizlendi. Asetabular kaviteye ligamentum kapitis ossis femorisin köken aldığı noktadan bir drill vasıtası ile asetabular tünel oluşturuldu. Drill kalınlığı hayvanların türüne, ırkına ve büyüklüğüne göre seçildi. Drill kalınlığı kedilerde 1.2 mm ile 2 mm arasında, köpeklerde ise 1.5 mm ile 3.2 mm arasında değişiklik gösterdi. Modifiye toggle aparatından misina geçirildi. Toggle aparatı bir hemostatik pens yardımı ile asetabular tünel içinden pelvik boşluğa yerleştirildi (Şekil 2b) ve misinalar gerdirilerek toggle pinin asetabulumun medial

Tablo 1: Kedilerde şekillenen koksofemoral çıkıklara ilişkin bilgiler

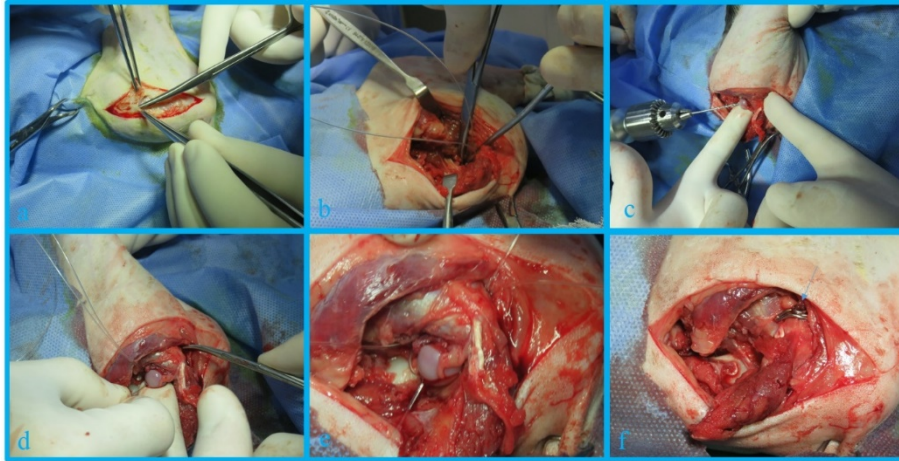
No	İrk	Cinsiyet	Yaş (ay)/Ağırlık (kg)	Anamnez	Taraf	Eşlik eden lezyonlar	Prognoz	Açıklama/Komplikasyon
1	Melez	Erkek	6/2.3	Trafik kazası	Sol	Sol tarsal instabilite + sağ metatarsal kırık	Mükemmel	Komplikasyon yok
2	Melez	Erkek	7/2.4	Trafik kazası	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
3	British Shorthair	Dişi	6/2.1	Yüksekten Düşme	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
4	Tekir	Erkek	5/2.0	Yüksekten Düşme	Sağ	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
5	Tekir	Dişi	8/3.1	Nedeni bilinmiyor	Sağ	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
6	Melez	Dişi	7/2.8	Nedeni bilinmiyor	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
7	Van Kedisi	Erkek	24/3.7	Yüksekten Düşme	Sol	Sol Radius ulna kırığı	Mükemmel	Komplikasyon yok
8	Tekir	Erkek	36/3.9	Yüksekten Düşme	Sağ	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
9	Melez	Erkek	11/4.1	Yüksekten Düşme	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
10	Tekir	Erkek	24/3.8	Yüksekten Düşme	Sağ	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
11	Melez	Dişi	48/4.4	Trafik Kazası	Sağ	Bilateral sakroiliyak çıkık	Mükemmel	Komplikasyon yok
12	Melez	Erkek	8/3.0	Trafik Kazası	Sağ	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
13	Melez	Erkek	24/4.0	Travma	Sol	Yok	İlimli	Operasyondan 10 gün sonra travmaya bağlı reluksasyon

Tablo 2: Köpeklerde şekillenen koksofemoral çıkıklara ilişkin bilgiler

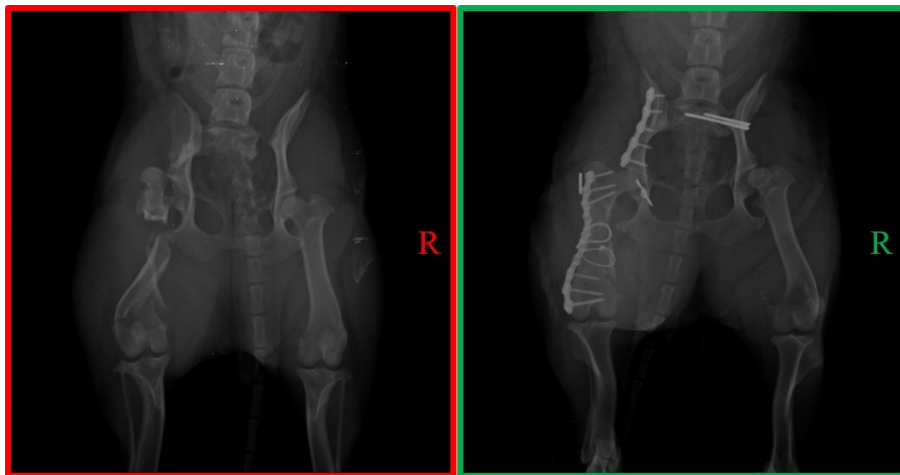
No	İrk	Cinsiyet	Yaş (ay)/Ağırlık(kg)	Anamnez	Taraf	Eşlik eden lezyonlar	Prognoz	Açıklama/Komplikasyon
1	Rotweiller	Erkek	7/26.4	Nedeni bilinmiyor	Sol	Yok	İlimli	Topallık Subluksasyon-Preoperatif grafide asetabulumun dorsal çatısında düzleşme ve asetabulumda şişleşme
2	Melez	Erkek	48/32.6	Nedeni bilinmiyor	Sağ	Yok	İlimli	Hafif topallık Subluksasyon-Preoperatif asetabulum içerisinde osteofitik üremeler
3	Melez	Erkek	4/8.2	Nedeni bilinmiyor	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
4	Terrier	Dişi	23/6.4	Nedeni bilinmiyor	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
5	German Setter	Dişi	35/16.7	Travma	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
6	Golden Retriever	Dişi	8/26.8	Kalça çıkığı şüphesi	Sağ	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
7	Golden Retriever	Erkek	42/30.2	Trafik kazası	Sol	Yok	Mükemmel	Komplikasyon yok
8	Terrier Melezi	Erkek	25/10.3	Nedeni bilinmiyor	Sol	Yok	İlimli	Hafif topallık-Subluksasyon-Preoperatif grafide asetabulum dorsal çatısında düzleşme ve asetabulumda şişleşme- Kaput femoriste düzleşme ve kollum femoriste kalınlaşma
9	Melez	Erkek	60/25.0	Trafik kazası	Sağ	Sol art. kübiti çıkığı	Mükemmel	Komplikasyon yok
10	Rotweiller	Dişi	5/15.4	Trafik kazası	Sol	Bilateral sakroiliyak çıkık+ sağ intrapelvik kırık	İlimli	Subluksasyon – Postoperatif osteofitik üremeler, Topallık Eşlik eden kırıklar var
11	Melez	Dişi	18/18.1	Trafik kazası	Sağ	Sol tibia kırığı + sol intrapelvik kırık	İyi	Hafif topallık -Eşlik eden kırıklar var-Hafif subluksasyon
12	Melez	Dişi	6/12.3	Nedeni bilinmiyor	Sol	Sol suprakondüler femur kırığı + sol trochanter major kırığı	Mükemmel	Komplikasyon yok
13	Terrier	Erkek	132/8.5	Kucaktan düşme	Sağ	Yok	İlimli	Operasyondan 3 ay sonra travmaya bağlı reluksasyon şekillendi-Eksizyon artroplastisi uygulandı
14	Golden Retriever	Erkek	4/10.1	Trafik kazası	Sağ	Sağ femur kırığı	Mükemmel	Komplikasyon yok
15	Pekinez	Erkek	108/6.8	Nedeni bilinmiyor	Sağ	Yok	İlimli	Operasyondan 12 gün sonra travmaya bağlı reluksasyon şekillendi- Eksizyon artroplastisi uygulandı
16	Golden Retriever	Dişi	6/15.4	Trafik kazası	Sol	Sol femur kırığı + sağ ve sol ischii kırığı	Mükemmel	Komplikasyon yok
17	Melez	Dişi	24/22.4	Nedeni bilinmiyor	Sol	Sağ tibia kırığı	Mükemmel	Komplikasyon yok
18	Terrier	Dişi	22/11.0	Trafik kazası	Sol	Sol suprakondüler femur kırığı + sol subtrochanterik femur kırığı + sol ilium kırığı + sağ sakroiliyak çıkık	Mükemmel	Komplikasyon yok
19	Alman Shepherd	Erkek	60/32.4	Nedeni bilinmiyor	Sağ	Sağ patellar çıkık	İyi	Hafif topallık-Hafif subluksasyon
20	Melez	Erkek	34/25.4	Trafik kazası	Sağ	Yok	İyi	Topallık yok – Preoperatif grafide diğer kalça ekleminde de subluksasyon görünüyor-Subluksasyon



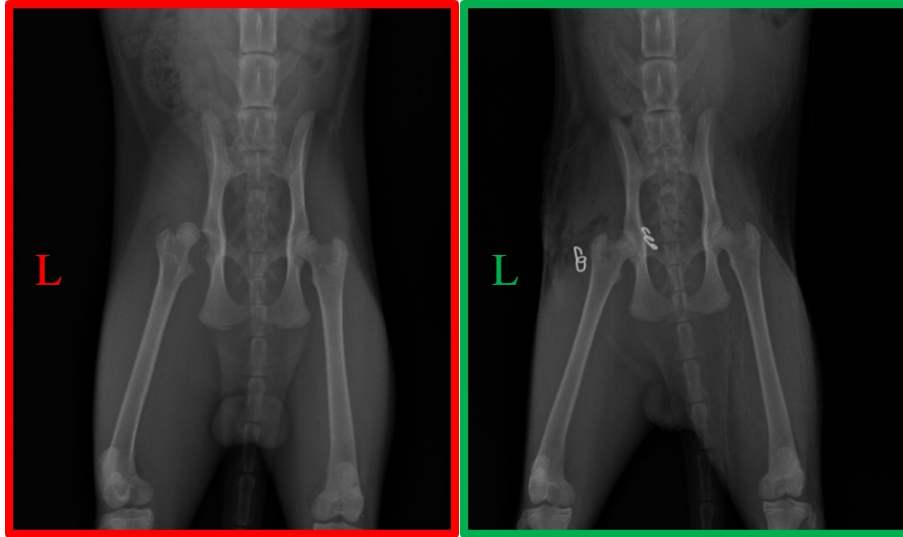
Şekil 1: a) Modifiye Toggle Pin ve rondelalar b) İçinden misina geçirilip uygulamaya hazır haldeki Modifiye Toggle Pin



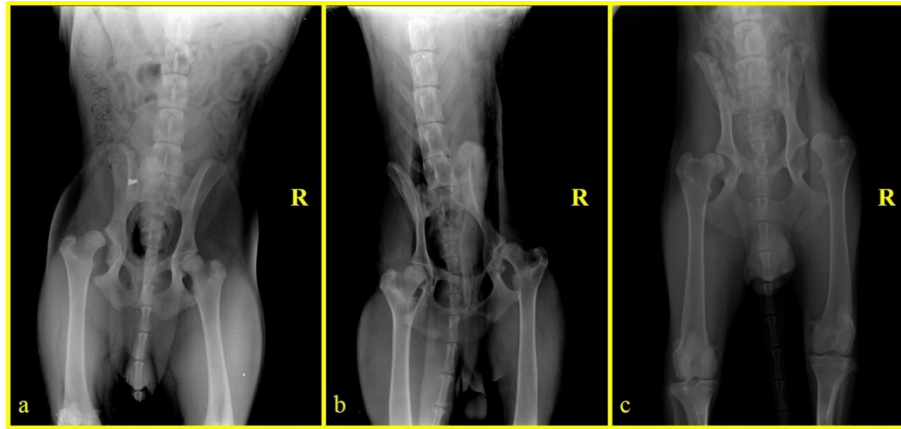
Şekil 2: a) Kraniolateral ensizyon b) Modifiye Toggle Pinin asetabular tünele uygulanması c) Femoral tünel oluşturulması d-e) Femoral tünelden misinanın ilerletilmesi f) Lateral stabilizasyon



Şekil 3: Koksofemoral çıkığa eşlik eden patolojileri olan bir köpeğin operasyon öncesi ve sonrası radyografik görüntüleri (Olgu 18)



Şekil 4: Olgu 9'un operasyon öncesi ve sonrası radyografik görüntüleri



Şekil 5: Olgu 1, olgu 2 ve olgu 20'nin operasyon öncesi çekilen radyografilerinde koksofemoral çıkığa eşlik eden diğer patolojik görüntüler a) Olgu 1 b) Olgu 2 c) Olgu 20

duvarına yaslanması sağlandı. Daha sonra kaput femorise, ligamentum capitis ossis femorisin köken aldığı nokta ile trochanter major hattı arasında bir tünel oluşturuldu (Şekil 2c). Femoral tünelden misinanın uçları geçirildi (Şekil 2d-e). Kaput femoris eklem içine yerleştirildikten sonra eklem hareketi kontrol edilerek misina uçları trochanter majorün lateral kısmında düğümlendi (Şekil 2f). Misinanın bağlandığı noktada lateral stabilizasyon için 3 farklı yöntem kullanıldı. Tüm vakalar değerlendirildiğinde 7 vakada trochanter majore açılan transvers bir delikten misina geçirilerek misina uçları düğümlendi. 22 vakada kirschner telinden oluşturulan modifiye toggle aparatı kullanıldı. 4 vakada ise rondela kullanıldı. Eklem kapsülası sağlam olan vakalarda 2/0, 0 ya da 1 numara poliglukolik asit emilebilir sütür materyali (Glikosorb, Ankara, Türkiye) ile kapsula yeniden dikilerek kapatıldı. Kaslar, derialtı bağ dokusu ve deri poliglukolik asit emilebilir sütür materyali (2/0-0-1 numara) (Glikosorb, Ankara, Türkiye) ile dikildi.

Postoperatif Bakım: Opere edilen bacağı yumuşak bandaj uygulandı ve 7 gün boyunca günlük pansuman yapılması ve bandaj uygulanması önerildi. Hastanın bacağına kullanmasını teşvik etmek amacı ile herhangi bir destekli bandaj uygulanmadı. Egzersiz 2 ile 4 hafta arasında sadece yürüme ile sınırlandırıldı. Postoperatif antibiyotik olarak günde iki defa kas içi olarak 30 mg/kg dozunda 7 gün sefazolin sodyum (Sefazol, Mustafa Nevzat, Türkiye), antiinflamatuvar olarak köpeklerde günde bir defa oral olarak 3 mg/kg dozunda 5 gün karprofen (Rimadyl®, Pfizer, USA), kedilerde ise günde bir defa oral olarak 3 mg/kg dozunda 5 gün tolfenamik asit (Tolfedine®, Novakim, Turkey) kullanıldı.

Bulgular

Toplam 33 vakada yapılan klinik ve radyografik muayeneler sonucunda koksofemoral çıkık tespit edildi ve toggle pin uygulanarak 1 aylık sağaltım

sonuçları değerlendirildi. Değerlendirme kriteri olarak postoperatif komplikasyonlar (reluksasyon, subluksasyon, üreme), topallık (hafif, şiddetli) ve normal fonksiyonların kazanımı (ılımlı, iyi, mükemmel) ele alındı (Tablo 1 ve 2). Diğer vakalarda eşlik eden lezyonlar ise Tablo 1 ve Tablo 2 de sunuldu. Kedilerin yaş ortalaması 13.8 ay, köpeklerin yaş ortalaması ise 33.5 ay idi. Kedilerin ağırlık ortalaması 3.2 kg, köpeklerin ağırlık ortalaması 18.0 kg idi. Klinik muayenede ilgili ekstremitenin kullanılmadığı veya parmak ucuyla yere dokunduğu, hassasiyet ile birlikte ağrısı olduğu ve bacak duruşunun anormal olduğu gözlemlendi. Radyografik olarak ise bir vaka hariç tüm vakalarda kraniodorsal yönde çıkık görüldü. Topallama şikayeti olan bir vakada ise radyografik muayenede kaput femorisin eklemde olduğu görülürken klinik muayenede rahatlıkla koksofemoral çıkık şekillendiği tespit edildi. 3 kedide (olgu 1, 7, 11) ve 9 köpekte (olgu 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19) koksofemoral çıkıklara eşlik eden patolojiler (kırık ve çıkıklar) vardı (Tablo 1 ve 2). Bunlar arasında en ağır vaka sol koksofemoral çıkığın yanı sıra sol suprakondüler femur kırığı, sol subtrohanterik femur kırığı, sol ilium kırığı ve sağ sakroiliyak çıkık da bulunan olgu 18 idi (Şekil 3). Sadece bir kedide ameliyattan 10 gün sonra tekrar travmaya maruz kalması sonucu reluksasyon şekillendi (%8). Diğer kedilerde herhangi bir komplikasyon oluşmadı ve toplam 13 kedide %92 oranında başarı kaydedildi. Şekil 4'te koksofemoral çıkık şekillenen bir kedinin operasyon öncesi ve sonrası grafileri gösterilmektedir.

Köpeklerde ise olgu 1, 2, 8, 10 ve 20'de preoperatif radyografide asetabulum ile ilgili farklı patolojiler görüldü (Şekil 5). Köpeklerdeki olgu 1, 2, 8, 10, 11 ve 19'da hafif topallama varken olgu 20'de topallama olmadığı dikkati çekti. Köpeklerdeki olgu 1, 2, 8, 10, 11, 19 ve 20'de radyografik olarak subluksasyon tespit edildi (%40). Bu vakalardan 10 ve 20'de, topallama şikayetinin preoperatif radyografide tespit edilen başka patolojilerden kaynaklı olduğu, olgu 19'da ise, toggle pin için kullanılan ipin gevşemesi sonucu subluksasyondan kaynaklandığı düşünüldü. Olgu 13 ve 15'de postoperatif travmaya maruz kalınması sonucu reluksasyon şekillendi ve eksizyon artroplastisi uygulandı (%10). Kedilerde 13 no'lu vakada postoperatif 10. günde yeniden travmaya maruz kalması sonucu reluksasyon şekillendi ve eksizyon artroplastisi yapıldı (%8). Bununla beraber kedilerde olgu 1, 7 ve 11'de çıkığa eşlik eden başka kırıklar vardı (Tablo 1). Köpeklerde 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18 ve 19'da kalça eklemine var olan patolojilerin dışında kalça çıkığına eşlik eden başka kırık ve çıkıklar vardı (Tablo 2). Hem kedilerde hem de

köpeklerde kullanılan toggle pin aparatı ile ilgili herhangi bir komplikasyon görülmedi.

Postoperatif dönemde kedilerin bacaklarını ortalama 5-7 gün içinde kullanabildikleri ve hafif sakındıkları, 14 gün sonunda ise rahatlıkla kullandıkları ve eski hareketlerine döndükleri görüldü. Köpeklerde ise olgu 1, 2, 8, 10, 11, 19'da postoperatif 7. günde halen ilgili ekstremiteyi aktif kullanmadıkları, sadece pati ucuyla yere dokundukları görüldü. Postoperatif 6. haftada ise ilgili bacağı daha rahat kullandıkları ancak hafif topallama şikayetlerinin devam ettiği öğrenildi.

Tartışma ve Sonuç

Koksofemoral çıkıklar, kedi ve köpeklerde en fazla karşılaşılan çıkık tipidir (Perez-Aparicio ve Fjeld, 1993). Büyük oranda (yaklaşık %80) kraniodorsal yönde oluşurken, daha az oranda kranioventral (%2-3), kaudovertral (%1,5-3) ve kaudodorsal çıkıklara rastlanır (Çetinkaya ve Olcay, 2011; Ergin ve ark., 2016). Kraniodorsal yönde olmasının en önemli nedeni iliopsoas ve güçlü gluteal kasların femur başını yukarıya ve öne doğru çekmesidir (Meij ve ark., 1992; Perez-Aparicio ve Fjeld, 1993). Çalışmamızda da bir olgu hariç bütün çıkıklar kraniodorsal yönde idi. Bir olguda ligamentum kapitis ossis femoris kopmasına rağmen kaput femoris eklem içinde idi, ancak klinik muayene ile rahatlıkla yerinden çıkarılıp tekrar yerine yerleştirilebiliyordu.

Daha önceki çalışmalarda kalça çıkıklarının temel nedenleri arasında motorlu taşıt kazalarının ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir (Demko ve ark., 2006; Evers ve ark., 1997; Trostel ve ark., 2020). Çalışmamızda kedilerde yüksekten düşme daha fazla görülürken, köpeklerde motorlu taşıt kazaları ile nedeni bilinmeyen durumlar ön plandaydı.

Kieves ve ark. (2014), koksofemoral çıkıklarda kontralateral uzuvda eşzamanlı ortopedik yaralanma olduğunda çıkık olan kalçaya daha erken zamanda ağırlık yükleneceği için toggle pin uygulamasının endike olduğunu söylemişlerdir. Çalışmamızda kedilerde her dört vakanın birinde, köpeklerde ise her iki vakanın birinde aynı ya da karşı bacakta eşlik eden kırık veya çıkıklar vardı.

Trostel ve ark. (2020) yapmış oldukları çalışmada toplam vakalarının %59'unda kalça çıkığına eşlik eden ek yaralanmalar bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu oran kedilerde %23, köpeklerde ise %45 olarak tespit edilmiştir. Bu da bize kalça çıkığı ile gelen vakalarda tam bir ortopedik ve nörolojik muayene yapmanın önemini göstermiştir. Ayrıca köpeklerde şekillenen kalça çıkıklarında vakaların yüksek enerjili bir travmaya maruz kaldığı açıkça görülmektedir. Bu durumun nedeni olarak

köpeklerin kedilerden daha büyük hacim ve ağırlığa sahip olmalarından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Kalça çıkıklarında, toggle stabilizasyonu için TightRope sisteminin kullanımında, kedilerde ve küçük ırk köpeklerde (<15 kg) mükemmel sonuçlar bildirilmiştir (Kieves ve ark., 2011; Kieves ve ark., 2014). Modifiye pin stabilizasyon yöntemi kullanılan çalışmamızda, kedilerin ortalama 3.2 kg, köpeklerin ise 18.0 kg olduğu tespit edilmiştir. Kedilerde sonuçlar mükemmel olarak ortaya çıkarken (%92), köpeklerde ise %50 oranında bir başarı sağlandığı görülmüştür. Bu durum, köpeklerin ağırlık ortalamasının kedilere göre fazla oluşuna, kalça eklemdeki preoperatif patolojilere ve eşlik eden diğer lezyonların fazla olmasına bağlanmıştır.

Toggle pin stabilizasyonunun prosedürü için toggle, dikiş ve sabitleme düğmesi gibi farklı seçenekler mevcuttur. Ancak prospektif bir klinik çalışmada hiçbir sistemin üstünlüğü kanıtlanamamıştır (Kieves ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada monofilament naylon sütün kullanılarak sağlanan Toggle pin stabilizasyonunda, reluksasyon şekillenmediği sürece sonucun olumlu olduğu bildirilmiştir (Trostel ve Fox, 2020). Ligamentum kapitis ossis femorisin yerine, yüksek dayanıklılıkta ve monofilament yapıda, kopması sonucu oluşabilecek reluksasyon olasılığı minimum olan, ekstraartiküler stabilizasyon amacıyla birçok çalışmada denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmış, kolay bulunabilir, ucuz ve reaksiyon oluşturmeyen balıkçı misinası kullanılabilir (Altuğ ve ark., 2019; Çetinkaya ve Olcay, 2011). Çalışmamızda ligamentum kapitis ossis femorisin yerine materyal olarak monofilament balıkçı misinası kullanıldı.

Açık redüksiyonun komplikasyonları arasında reluksasyon, enfeksiyon, implant yer değiştirmesi veya başarısızlığı, nörolojik hasar ve eklem kırıkdağında hasar bulunmaktadır. Reluksasyon oranları değişkendir ve Toggle pin stabilizasyonu olan vakaların %11-25'inde meydana geldiği bildirilmiştir (Kieves ve ark., 2014). Daha önceki çalışmalarda ayrıca ameliyat sonrası %21'den %25'e kadar istenmeyen komplikasyon oranları bildirilmiştir. Bunlar içinde en yaygın olanı ise yine toggle pin sütünün kopması sonucu yeniden şekillenen çıkıklardır. Toggle pin stabilizasyonu, köpeklerde kalça çıkıklığını tedavi etmek için rutin olarak yapılır (Jha ve Kowaleski, 2012). Toggle pin stabilizasyonunun daha önce bildirilen komplikasyonları arasında femur başının protez bağının kırılmasından sonra şekillenen reluksasyon, Toggle pinin kırılmasından sonra oluşan reluksasyon, femur başının kırılması ve kullanılan protez materyali tarafından femur boynunun kırılması yer almaktadır (Baltzer ve ark., 2001; Kieves ve ark., 2014). Bununla beraber politravmalı vakalarda kalça çıkığı olan ekstremitte üzerine erken

yüklenmeler olabilir. Bu da reluksasyon oranlarını artırabilir (Trostel ve ark., 2020). Trostel ve ark. (2020), Toggle pin tekniğinin, femur başı ve asetabulumun altta yatan morfoloji değişmediğinde köpeklerde uygulanan yerleşik ve rutin bir prosedür haline geldiğini ve pasif stabilizeye yardımcı olan femur başı ligamentinin fonksiyonel olarak değiştirilmesini sağladığı için etkili bir teknik olduğunu vurgulamışlardır. Bahsi geçen durum çalışmamıza dahil ettiğimiz köpeklerde yapılan operasyonlarla desteklenmiştir. Köpeklerde olgu 1, 2, 8, 10 ve 20'de preoperatif radyografilerde kalça eklemde patolojik görüntüler tespit edilmiştir (Şekil 5).

Yapılan çalışmalarda reluksasyon oranları ortalama %5.8 ile %29 arasında değişmektedir (Bone ve ark., 1984; Demko ve ark., 2006; Kieves ve ark., 2014; Trostel ve ark., 2020). Çalışmamızda ise bu oran kedilerde %8, köpeklerde ise %10'du. Ancak köpeklerde majör komplikasyon %40 oran ile subluksasyon olarak değerlendirilmiştir. Kedilerde ise 13 vakadan sadece 1 vakada yeniden travmaya maruz kalma sonucu reluksasyon görülmüştür (%8).

Demko ve ark. (2006), Toggle pin stabilizasyonunun, diğer stabilizasyon tekniklerine kıyasla, eklem fonksiyonunun erken dönmesine izin vermesi ve kırıkdağ sağlığını koruması açısından potansiyel bir avantaj olduğunu vurgulamışlardır. Bununla birlikte, reluksasyonu önlemek için ameliyattan sonraki ilk hafta dikkatli olunması gerektiğini söylemişlerdir. Çalışmamızda da postoperatif dönemde ilk 10 günlük sürede hareket kısıtlamasına gidilmiştir. Toggle pin stabilizasyon cerrahisi sonrası karşılaşılan enfeksiyon oranı oldukça düşüktür (Trostel ve ark., 2020). Çalışmamızda herhangi bir vakada enfeksiyon ile karşılaşmamıştır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmada kedilerde kalça çıkıklarında kullanılan tekniğin özelliklerine bakılmaksızın toggle pin stabilizasyonu ile başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür. Özellikle köpeklerde koksofemoral çıkık durumlarında kullanılan teknikten ziyade, uygun vaka seçiminin çok önemli olduğu ve sonuca önemli ölçüde etki edebileceği ortaya konmuştur.

Kaynaklar

- Altuğ ME, Yurtal Z, Devenci MZY, İşler CT, Alakuş H. 2019: Treatment of Coxofemoral Luxation and Type-1 Salter Harris Femur Fracture in a Cat by Toggle Pin and Cross Pin Methods. *Van Vet J*, 30 (1), 67-69.
- Baltzer WI, Schulz KS, Stover SM, Taylor KT, Kass PH, 2001: Biomechanical analysis of suture anchors and suture materials used for toggle pin stabilization of hip joint luxation in dogs. *Am J Vet Res*, 62, 721-728.
- Basher AWP, Walter MC, Newton CD, 1986: Coxofemoral luxation in the dog and cat. *Vet Surg*, 15, 356-362.

- Bone DL, Walker M, Cantwell HD, 1984: Traumatic coxofemoral luxations in dogs, results of repair. *Vet Surg*, 13, 263-270.
- Çetinkaya MA, Olcay B, 2010: Modified Knowles toggle pin technique with nylon monofilament suture material for treatment of two caudoventral hip luxation cases. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 23, 114-118.
- Demko JL, Sidaway BK, Thieman KM, Fox DB, Boyle CR, McLaughlin RM, 2006: Toggle rod stabilization for treatment of hip joint luxation in dogs: 62 cases (2000-2005). *J Am Vet Med Assoc*, 229, 984-989.
- Ergin İ, Şenel OO, Özdemir Ö, Uluşan S, Bilgili, H, 2016: Kedilerde koksofemoral eklem luksasyonlarının çift taraflı modifiye toggle pin tekniği ile sağaltımı ve erken dönem sonuçlarının değerlendirilmesi: 17 olgu. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 63, 121-126.
- Evers P, Johnston GR, Wallace LJ, Lipowitz AJ, King VL, 1997: Long-term treatment of traumatic coxofemoral joint dislocation in dogs: 64 cases (1973-1992). *J Am Vet Med Assoc*, 210, 59-64.
- Jha S, Kowaleski MP, 2012: Mechanical analysis of twelve toggle suture constructs for stabilization of coxofemoral luxations. *Vet Surg*, 41 (8), 948-953.
- Kieves NR, Lotsikas PJ, Canapp SO, 2011: Hip toggle stabilization using the TightRope1 system in 9 dogs. *Vet Surg*, 40 (7).
- Kieves NR, Lotsikas PJ, Schulz KS, Canapp SO, 2014: Hip toggle stabilization using the TightRope® system in 17 dogs: technique and long-term outcome. *Vet Surg*, 43(5), 515-522.
- Knowles AT, Knowles JO, Knowles RP, 1953: An operation to preserve the continuity of the hip joint. *J Am Vet Med Assoc*, 123, 508-515.
- Meij BP, Hazewinkel AW, Nap RC, 1992: Results of extra-articular stabilisation following open reduction of coxofemoral luxation in dogs and cats. *J Small Anim Pract*, 33, 320-326.
- Off W, Matis U, 2010: Excision arthroplasty of the hip joint in dogs and cats. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 23, 297-305
- Pérez-Aparicio FJ, Fjeld TO, 1993: Coxofemoral luxations in cats. *J Small Anim Pract*, 34(7), 345-349.
- Pratesi A, Grierson J, Moores AP, 2012: Toggle rod stabilisation of coxofemoral luxation in 14 cats. *J Small Anim Pract*, 53 (5), 260-266.
- Trostel CT, Fox DB, 2020: Coxofemoral Joint Luxation in Dogs Treated with Toggle Rod Stabilization: A Multi-Institutional Retrospective Review with Client Survey. *J Am Anim Hosp Assoc*, 56 (2), 83-91.

*Yazışma Adresi: Ziya YURTAL

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

e-mail: z_yurtal@hotmail.com

The Effect of Turkish Coffee on Performance, Biochemical, and Physiological Parameters in Rabbits

Mustafa MAKAV^{1,a,*}, Mükremin ÖLMEZ^{2,b}, Hüseyin Avni EROĞLU^{3,c}, Tarkan ŞAHİN^{2,d}

¹Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Kars, Turkey.

²Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Kars, Turkey.

³Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Çanakkale, Turkey.

^aORCID: 0000-0003-1879-8180, ^bORCID: 0000-0002-5003-3383, ^cORCID: 0000-0002-1040-3255,

^dORCID: 0000-0003-0155-2707

Geliş Tarihi: 27.11.2020

Kabul Tarihi: 26.02.2021

Abstract: Coffee is one of the most widely consumed hot beverages in the world. Melanoidins, which are formed with brown color during coffee roasting, are reported to be a strong antioxidant. Discussions related to the more and less consumption of coffee still continue. This study investigated the effect of a low and high amount of coffee consumption on antioxidant parameters in this context. A total of 15 female New Zealand rabbits weighing 1500-2500 g were used in the study. The control group was fed as *ad-libitum* control with basal feed. 1% and 5% Turkish coffee were added to the feed of the 1% TC and 5% TC groups, respectively. Blood was collected once a week throughout the study. All animals were euthanized in accordance with ethical rules at the end of the study. Samples (plasma and tissue) were taken for the analyses. Glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) analyses were performed on all samples. Plasma GSH values were observed to increase in the groups given TC according to the analyses. Plasma MDA values decreased in the TC groups. An increase was observed in liver and heart tissue in the TC group upon the evaluation of tissue GSH parameters. MDA values were found to decrease in lung, heart, and kidney tissues in TC groups. Additional effects were observed in plasma and tissues in the 5% TC group upon the evaluation of 1% TC and 5% TC groups. No statistical differences were found in performance parameters. It has been revealed as a result that TC is a strong antioxidant, and its effect increases in high consumption.

Keywords: GSH, MDA, Turkish coffee.

Türk Kahvesinin Tavşanlarda Performans, Biyokimyasal ve Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Özet: Kahve dünyada en yoğun tüketilen sıcak içeceklerdendir. Kahve kavrulması sırasında başlayan kahverengi rengi ile meydana gelen melanoidin güçlü antioksidan olarak bildirilmektedir. Kahvenin az ve çok kullanımı ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Bu bağlamda bu çalışmada az ve yoğun alınan kahvenin antioksidan parametreler üzerine etkisini araştırıldı. Çalışma kapsamında 1500-2500 g ağırlığında toplamda 15 adet dişi Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Kontrol grubuna normal yem ile *ad-libitum* olarak beslendi. %1 TK ve %5 TK grubunda ise rasyonlarına sırasıyla %1 ve %5 Türk kahvesi ilave edildi. Çalışma boyunca haftada bir kan alındı. Çalışma sonunda etik kurallara uygun bir şekilde tüm hayvanların yaşamına son verildi. Analizler için gerekli numuneler (Plazma ve Doku) alındı. Alınan tüm numunelerden glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) analizi yapıldı. Yapılan analizlere göre plazma GSH değerleri TK verilen gruplarda artış gözlemlendi. Plazma MDA değerlerinde ise TK gruplarında azalma belirlendi. Doku GSH parametreleri değerlendirildiğinde ise karaciğer ve kalp dokusunda TK grubunda artış gözlemlendi. Doku MDA değerlerinde ise akciğer, kalp ve böbrek dokusunda TK gruplarında azalma belirlendi. %1 TK ve %5 TK değerlendirildiğinde plazma ve dokularda %5 TK'de daha fazla etki gözlemlendi. Performans parametrelerinde ise istatistiksel bir fark belirlenmedi. Sonuç olarak, TK'nın güçlü bir antioksidan olduğu ve yoğun kullanımda etkisinin arttığı ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: GSH, MDA, Türk Kahvesi.

Introduction

Coffee and tea are among the most widely consumed beverages. However, studies on tea are more common than coffee in *in vivo* and *in vitro* studies. Many heat treatment procedures are applied to coffee from the beginning of production. Melanoidins, which are brown polymers formed by Maillard reaction during roasting of coffee, the beginning of these processes, constitute 25% of the dry substances of coffee beverages. Likewise, melanoidins were to increase in heat treatment

during brewing (Borrelli et al., 2002). Melanoidins formed in the last stage of the Maillard reaction were to have certain functional properties such as antioxidant, antimicrobial, and antihypertensive activities (Rufian-Henares and Morales, 2007). In particular, the mechanism of antioxidant action relies on their ability to capture positively charged electrophilic species, purify oxygen radicals, or perform metal chelation to form inactive complexes

(Delgado-Andrade et al., 2005; Pastoriza and Rufián-Henares, 2014).

Antioxidants are important compounds that help us stay healthy by reducing oxidative stress caused by the overproduction of reactive oxygen (ROS) or nitrogen species (RNS). The terms "ROS" and "RNS" refer to various free radicals such as superoxide, hydroxyl, peroxy, nitric oxide, nitrogen dioxide radicals, and non-radical reagents in general such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and peroxy nitrite. These free radicals are produced in our organism under normal physiological conditions but exacerbate under pathological conditions and play an important role in pathological processes and regulatory activities. Antioxidants can scavenge free radicals in the organism, inhibit pro-oxidative enzymes, and chelate metal ions (Martinez-Gomez et al., 2020). Melanoidins were reported to provide protection against DNA damage caused by ROS (Langner and Rzeski, 2014).

Measuring levels of DNA/RNA damage, lipid peroxidation, and protein oxidation/nitration instead of direct measurement of reactive oxygen species indirectly reveals oxidative stress. A common method of determining the degree of lipid peroxidation is to measure the level of malondialdehyde (MDA), a by-product of the lipid peroxidation process. In addition, the measurement of changes in reduced glutathione (GSH) concentration, an endogenous antioxidant, was also used as an indicator of the severity of lipid peroxidation (Smith et al., 2005).

The antioxidant effect on some tissues and plasma was determined by adding coffee to the feed of New Zealand rabbits in our study.

Material and Methods

Animals and Trial Design: The study was started after the approval of the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Kafkas University (KAÜ-HADYEK/2020-006). The rabbits were supplied by the Atatürk University Experimental Animal Breeding Unit. A total of 15 female New Zealand rabbits weighing 1500-2500 g were used in the study. The rabbits were divided into 3 groups with 5 animals in each group. Animals were individually housed in cages specially designed for their species and fed as *ad-libitum* with basal feed (%16 CP and 2500 kcal/kg ME). The temperature of the room where the animals were housed was set to 25°C and the illumination was set to 12 hours of light and 12 hours of darkness. Body weight gain was determined by weighing the initial and final body weights of the rabbits. Feed consumption was recorded in all groups. The feed

conversion rate was calculated by dividing the feed consumption by the body weight gain.

Experimental groups are as follows;

Group I (Control): The control group fed as *ad-libitum* control with basal feed without any application,

Group II (1% Turkish Coffee): The group in which 1% Turkish Coffee (TC) was added to their feed for 21 days,

Group III (5% Turkish Coffee): The group in which 5% Turkish Coffee (TC) was added to their feed for 21 days.

Sampling and Analysis: Blood was collected from the ear veins of the animals once a week into anticoagulant tubes for 3 weeks. Tissue samples required for analysis were taken after all animals were euthanized under anesthesia on the 21st day in accordance with ethical rules at the end of the study. The tissue samples were homogenized with phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 3000 RPM for 5 minutes and their homogenates were separated. Blood samples were centrifuged at 3000 RPM for 5 minutes and their plasma was separated. Tissue homogenates and plasmas were stored at -20°C until the day of the analysis. GSH analysis was determined according to the method of Beutler et al. (1963) whereas the method of Yoshioka et al. (1979) was used in MDA analysis.

Statistical Analysis: One-way analysis of variance (ANOVA) method was used to determine the differences between the initial body weights, final body weights, body weight gain, feed consumption, feed conversion ratio, and MDA and GSH values between the groups. GLM Repeated Measures test was used to analyze the measurement results of MDA and GSH parameters of the groups on the 0th, 7th, 14th, and 21st days of the study (Graphpad Prism 8/San Diego, CA). The results were interpreted using Tukey's HSD test. The results were given as mean±standard deviation (SD).

Results

Plasma GSH values of the control (13.34±0.43, 13.68±0.38, 13.56±0.80, 13.60±0.56, respectively), 1% TC (13.61±0.29, 14.23±0.20, 14.57±0.54, 14.98±0.43, respectively), and 5% TC (13.49±0.80, 14.53±0.31, 14.67±0.55, 15.79±0.25, respectively) groups on the 0th, 7th, 14th, and 21st days are presented in Figure-1A. A significant increase was found on the 21st day in the 1% TC (p<0.01) and 5% TC (p<0.0001) groups compared to the control group upon the evaluation of the plasma GSH parameter. A significant increase was found on the 21st day (p<0.05) in the 1% TC group compared to the 0th day. A significant increase was found on the

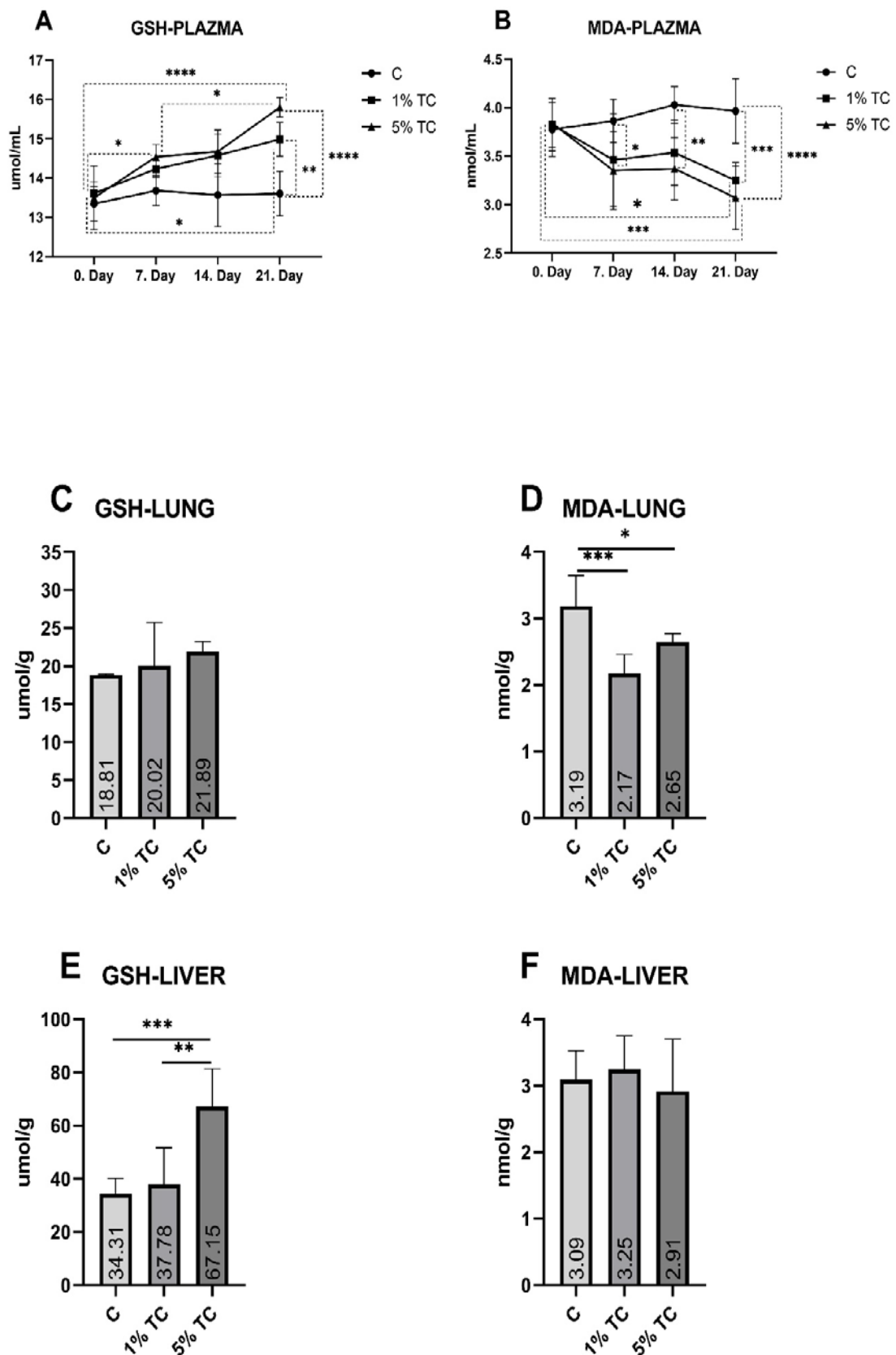


Figure 1. Means and Std. deviation of the three groups for biochemical parameters. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

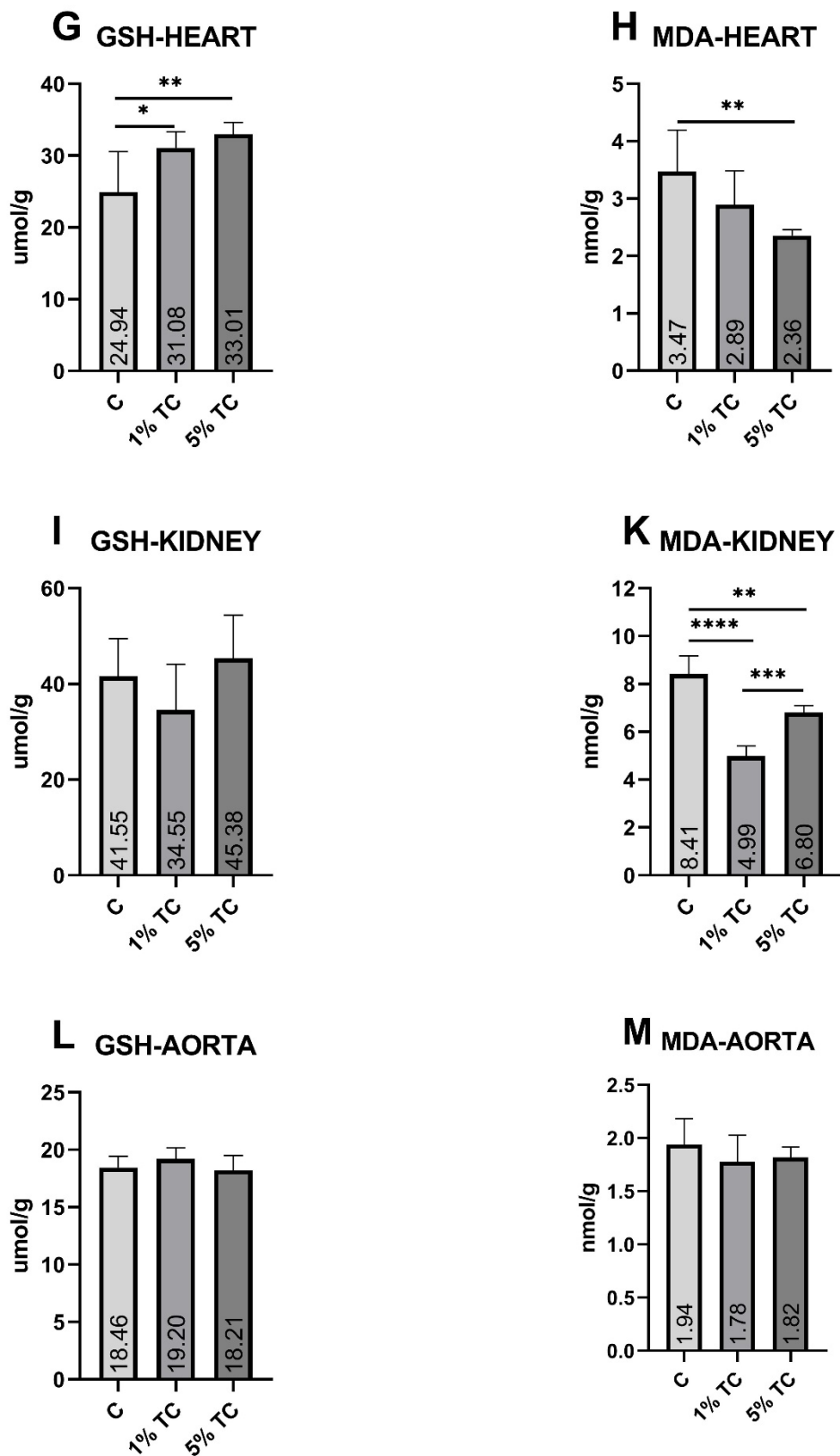


Figure 2. Means and Std. deviation of the three groups for biochemical parameters. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

7th day ($p<0.05$) and the 21st day ($p<0.0001$) in the 5% TC group compared to the 0th day. A statistical increase was also observed on the 21st day (15.79 ± 0.25) compared to the 7th day ($p<0.05$).

Plasma MDA values of the control (3.77 ± 0.28 , 3.86 ± 0.22 , 4.02 ± 0.19 , 3.96 ± 0.33 , respectively), 1% TC (3.82 ± 0.27 , 3.46 ± 0.47 , 3.53 ± 0.34 , 3.24 ± 0.18 , respectively), and 5% TC (3.84 ± 0.24 , 3.35 ± 0.40 , 3.37 ± 0.32 , 3.07 ± 0.32 , respectively) groups on the 0th, 7th, 14th, and 21st days are presented in Figure-1B. A statistically significant decrease was found on the 7th, 14th, and 21st days ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.0001$, respectively) in the 5% TC group and on the 21st day ($p<0.001$) in the 1% TC group compared to 7th, 14th, and 21st days upon the evaluation of plasma MDA values. A significant decrease was observed on the 21st day in the 1% TC ($p<0.05$) and 5% TC ($p<0.001$) groups compared to the 0th day in the change of the groups by days.

GSH values in tissues are presented in Figure 1-C, 1-E, and Figure 2-G, 2-I, 2-L. A statistically significant increase was observed in both 1% TC (31.08 ± 2.28 , $p<0.05$) and 5% TC (33.01 ± 1.62 , $p<0.01$) groups compared to the control group (24.94 ± 5.61) in heart tissue. A significant increase was observed in the 5% TC (67.15 ± 14.24) group compared to the control (34.31 ± 5.86) group

($p<0.001$) in the liver tissue. A significant difference was also found between the 1% TC (37.78 ± 13.96) group and the 5% TC (67.15 ± 14.24) group in liver tissue ($p<0.01$). No statistical difference was found in kidney, lung, and aortic tissue ($p>0.05$).

MDA values in tissues are presented in Figures 1-D, 1-F, and Figures 2-H, 2-K, 2-M. A statistically significant decrease was found in lung tissue in the 1% TC (2.17 ± 0.28 , $p<0.001$) and 5% TC (2.64 ± 0.12 , $p<0.05$) groups compared to the control (3.18 ± 0.45) group upon the examination of tissue MDA data. Similarly, a significant decrease was observed in 1% TC (4.98 ± 0.41 , $p<0.0001$) and 5% (6.80 ± 0.29 , $p<0.01$) TC groups compared to the control group (8.41 ± 0.76) in kidney tissue. In addition, a significant difference was found between the 1% TC (4.98 ± 0.41) and 5% TC (6.80 ± 0.29) groups in kidney tissue ($p<0.001$). A statistical decrease was observed only in the 5% TC (2.35 ± 0.10) group compared to the control (3.47 ± 0.72) group ($p<0.01$) in the heart tissue. No statistical differences were found in kidney and aortic tissues ($p>0.05$).

The initial body weights, final body weights, body weight gain, feed consumption, and feed conversion rate of the animals are presented in Table 1. There was no statistical difference according to the results ($p>0.05$).

Table 1: Effect of TK on performance parameters of rabbits.

	Control	1% TC	5% TC	P
Initial Body Weight	2105.00±52.29	2091.00±43.17	2066.00±55.88	0.861
Final Body Weight	2248.00±66.72	2265.00±35.78	2218.00±69.17	0.852
Body Weight Gain (0-21 days)	142.20±22.19	174.50±21.39	151.70±35.18	0.691
Feed Consumption (0-21 days)	24.89±0.88	26.67±1.17	25.40±0.63	0.414
Feed Conversion Rate (0-21 days)	3.96±0.15	3.99±0.11	3.89±0.13	0.256

Discussion and Conclusion

Organisms try to detoxify these molecules, and oxidative stress arises because of the imbalance between the ability to detoxify these free radical products produced as a result of free radical production. Thus, it causes cellular damage. Free radicals are generally known as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which are reactive substances because they have one or more separating electrons (Sepidarkish et al., 2020). On the other hand, antioxidants are low or high molecular weight substances that try to prevent or repair cellular damage by destroying the harmful properties of free radicals (Poprac et al., 2017; Valko et al., 2007).

Free radicals are reported to be at low or moderate concentrations within cells and play a vital role in the cellular defense system by invading pathogenic agents (Sepidarkish et al., 2020). The most commonly used test to measure the effects of hydroxyl radical damage in cells is the thiobarbituric acid test for the presence of MDA. Furthermore, measuring changes in reduced glutathione (GSH) concentration, an endogenous antioxidant, has also been reported to be more effective in determining the severity of lipid peroxidation (West, 2000).

Melanoidins, known as powerful antioxidants, are available in many heat-treated products, especially beer, coffee, and tea. They exhibit antioxidative action by eliminating ROS and RNS, which cause oxidative damage (Cammerer et al., 2012). Our study has determined the antioxidative

effect of coffee given to rabbits. It is thought that this effect may be caused by melanoidins in coffee.

An inverse relationship was reported between coffee consumption and cirrhosis (Muriel and Arauz, 2010). Liver damage was also reported to be inversely proportional to coffee consumption in Italy and Japan (Kono et al., 1994; Muriel and Arauz, 2010; Ruhl and Everhart, 2005). Lv et al. (2010) evaluated the effect of caffeine against alcohol-related liver diseases and determined MDA and GSH values. They observed a decrease in MDA level and an increase in GSH level in the caffeinated group in relation to liver damage according to their study. Vitaglione et al. (2010) reported the antioxidant effect of melanoidins taken with coffee consumption on the liver in their study. An increase in GSH level was found in the group which was given coffee compared to the control group, similar to our study. Studies have shown that coffee physiologically increases the antioxidant capacity in liver damage. Studies on coffee and caffeine similarly reported that antioxidant parameters increased and oxidant parameters decreased (Amer et al., 2017; Nogaim et al., 2020; Shaposhnikov et al., 2018).

Stress is the main cause of cardiovascular diseases. Ischemic heart disease and stroke, especially associated with atherosclerosis, have been the leading cause of morbidity or mortality worldwide for decades. Oxidative stress has been found to be associated with some risk factors for atherosclerosis such as hypertension, diabetes mellitus, hyperlipidemia, obesity, and smoking. In addition, increased ROS formation in the arterial wall through oxidase activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) via Type 1 angiotensin II receptors causes increased oxidative stress (Cheng et al., 2017). Some researchers have reported that antioxidants in foods may inhibit the atherosclerosis process (Torres et al., 2015). Our study did not determine a statistical effect on the aorta related to coffee consumption whereas antioxidant GSH level in cardiac tissue increased and oxidant MDA level decreased. However, studies have reported that consumption of coffee prevents cardiovascular diseases, which supports our study (Kleemola et al., 2000; LaCroix et al., 1986; Wu et al., 2009). Another study reported that oxidative damage occurred by increasing the formation of ROS due to increased iron load in the liver (Güvendi et al., 2020). It is thought in such cases that coffee may have an antioxidant effect.

The exact mechanism by which coffee consumption reduces the risk of renal failure is not fully known. However, there are reports that various components of coffee (such as melanoidins, caffeine) can protect glomerular endothelial cells

from oxidative stress (Wijarnpreecha et al., 2017). We found in our study that the levels of MDA in the kidney tissue decreased in the groups which were given coffee, reducing the oxidant effect.

The mechanism of the antioxidative activity of melanoidins is not fully understood. However, it is believed to be based on the elimination of oxygen radicals and chelation of metals to form inactive complexes. Antioxidant activity has been demonstrated in both cell and animal experiments. Studies have reported that digested coffee melanoidins protect human hepatocytes, HepG2, under oxidative stress. Coffee melanoidins in humans have been reported to increase plasma antioxidant capacity by up to 7% in a short time after consumption and protect human lymphocytes against ROS-induced DNA damage (Rufián-Henares and Pastoriza, 2016). Our study has determined an increase in plasma antioxidant level but a decrease in the oxidant level.

It is seen as a result that the antioxidant capacity in blood plasma and tissues is increased with an antioxidant such as caffeine and melanoidins taken with coffee consumption. The increase in antioxidant capacity with intensive consumption shows that it is directly proportional to the increase in coffee use when 1% TC and 5% TC in our groups are compared.

References

- Amer MG, Mazen NF, Mohamed AM, 2017: Caffeine intake decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in experimental liver diseases induced by thioacetamide: Biochemical and histological study. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 30 (1), 13–24.
- Beutler E, Duron O, Kelly B, 1963: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882–888.
- Borrelli RC, Visconti A, Mennella C, Anese M, Fogliano V, 2002: Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. *J Agric Food Chem*, 50 (22), 6527–6533.
- Cammerer B, Chodakowski K, Gienapp C, Wohak L, Hartwig A, Kroh LW, 2012: Pro-oxidative effects of melanoidin–copper complexes on isolated and cellular DNA. *Eur Food Res Technol*, 234 (4), 663–670.
- Cheng Y-C, Sheen J-M, Hu WL, Hung Y-C, 2017: Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxid Med Cell Longev*, 26, 1-17
- Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Morales FJ, 2005: Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J Agric Food Chem*, 53 (20), 7832–7836.
- Güvendi GF, Eroğlu HA, Mustafa Makav, Güvendi B, Adalı Y, 2020: Selenium or ozone: Effects on liver injury caused by experimental iron overload. *Life Sci*, 262, 118558.

- Kleemola P, Jousilahti P, Pietinen P, Vartiainen E, Tuomilehto J, 2000: Coffee Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease and Death. *Arch Intern Med*, 160 (22), 3393.
- Kono S, Shinchi K, Todoroki I, Hatsuse K, 1994: Coffee and Serum Gamma-glutamyltransferase: A Study of Self-Defense Officials in Japan. *Am J Epidemiol*, 139 (7), 723–727.
- LaCroix AZ, Mead LA, Liang K-Y, Thomas CB, Pearson TA, 1986: Coffee Consumption and the Incidence of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*, 315 (16), 977–982.
- Langner E, Rzeski W, 2014: Biological Properties of Melanoidins: A Review. *Int J Food Prop*, 17 (2), 344–353.
- Lv X, Chen Z, Li J, Zhang L, Liu H, Huang C, Zhu P, 2010: Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm Res*, 59 (8), 635–645.
- Martinez-Gomez A, Caballero I, Blanco CA, 2020: Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10 (3), 400.
- Muriel P, Arauz J, 2010: Coffee and liver diseases. *Fitoterapia*, 81 (5), 297–305.
- Nogaim QA, Sai Pratyusha Bugata L, Pv P, Reddy UA, P MG, S IK, M M, 2020: Protective effect of Yemeni green coffee powder against the oxidative stress induced by Ochratoxin A. *Toxicol Rep*, 7, 142–148.
- Pastoriza S, Rufián-Henares JA, 2014: Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chem*, 164, 438–445.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes R Christopher J, Valko M, 2017: Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 38 (7), 592–607.
- Rufián-Henares JA, Morales FJ, 2007: Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res Int*, 40 (8), 995–1002.
- Rufián-Henares JA, Pastoriza S, 2016: Maillard Reaction. In: Encyclopedia of Food and Health (Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, Eds.). Academic Press, Oxford, p. 593–600.
- Ruhl CE, Everhart JE, 2005: Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*, 128 (1), 24–32.
- Sepidarkish M, Akbari-Fakhrabadi M, Daneshzad E, Yavari M, Rezaeinejad M, Morvaridzadeh M, Heshmati J, 2020: Effect of omega-3 fatty acid plus vitamin E Co-Supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr*, 39 (4), 1019–1025.
- Shaposhnikov S, Hatzold T, Yamani NE, Stavro PM, Lorenzo Y, Dusinska M, Reus A, Pasman W, Collins A, 2018: Coffee and oxidative stress: a human intervention study. *Eur J Nutr*, 57 (2), 533–544.
- Smith AM, Zeve DR, Grisel JJ, Chen W-JA, 2005: Neonatal alcohol exposure increases malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the developing cerebellum. *Dev Brain Res*, 160 (2), 231–238.
- Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR, 2015: Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res*, 46 (5), 408–426.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J, 2007: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (1), 44–84.
- Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoroso DC, Ribocco MT, Romano A, Fogliano V, Caporaso N, D'Argenio G, 2010: Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *HepatoL Baltim Md*, 52 (5), 1652–1661.
- West IC, 2000: Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*, 17 (3), 171–180.
- Wijarnpreecha K, Thongprayoon C, Thamcharoen N, Panjawatanan P, Cheungpasitporn W, 2017: Association of coffee consumption and chronic kidney disease: A meta-analysis. *Int J Clin Pract*, 71 (1), e12919.
- Wu J, Ho SC, Zhou C, Ling W, Chen W, Wang C, Chen Y, 2009: Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: A meta-analysis of 21 prospective cohort studies. *Int J Cardiol*, 137 (3), 216–225.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M, 1979: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanisms. *Am J Obstet Gynecol*, 135, 972–976.

***Correspondence:** Mustafa MAKAV

Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Pasacayırı Campus, 36100, Kars, Turkey.

e-mail: mustafamakav@gmail.com

Immunohistochemical assessment of S100, Vimentin, PCNA, p53 and MMP-9 expressions in bovine melanomas

Emin KARAKURT^{1,a,*}, Uğur AYDIN^{2,b}, Enver BEYTUT^{1,c}, Engin KILIÇ^{2,d}, Serpil DAĞ^{1,e}, Hilmi NUHOĞLU^{1,f}, Uğur YILDIZ^{2,g}, Ayfer YILDIZ^{3,h}, Emre KURTBAŞ^{3,i}

¹Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Kars, Turkey.

²Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Kars, Turkey.

³Kafkas University, Institute Health Sciences, Kars, Turkey.

^aORCID: 0000-0003-2019-3690 , ^bORCID: 0000-0001-5756-4841 , ^cORCID: 0000-0003-3360-2940 ,

^dORCID: 0000-0001-8126-3918 , ^eORCID: 0000-0001-7667-689X , ^fORCID: 0000-0003-2530-2542 ,

^gORCID: 0000-0002-4782-1012 , ^hORCID: 0000-0002-6569-5435 , ⁱORCID:0000-0002-9752-194X

Geliş Tarihi: 12.01.2021

Kabul Tarihi: 10.03.2021

Abstract: This study aimed to evaluate the expression of PCNA, p53, MMP-9, Vimentin and S100 immunohistochemically and determine the aggressiveness in diagnosis of bovine melanomas. The material of this study consisted of melanoma biopsy samples taken from 10 cattle brought to our department. Tissue samples from cattle were fixed in 10% buffered formalin solution. After routine procedures paraffin blocks were cut sections of 5 µm thickness. For bleaching, some heavily pigmented tumour sections were deparaffinized, hydrated, and incubated in 10% solution of hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 hours at 65°C until sections appeared clear and Hematoxylin & Eosin (H&E) staining was applied to the sections to detect histopathological changes. Sections were examined and photographed under a light microscope. Avidin-Biotin Peroxidase was used as the immunohistochemical method. We observed that the tumoral mass was solitary, firm, hairless, oval-round shaped and quite large. We detected spindle and epithelioid type tumoral cells containing a lot of large brownish-black granular melanin pigments in their cytoplasm. All melanoma cases were immune positive for S100, Vimentin, PCNA, p53 and MMP-9 expressions. In conclusion, we think that these immunohistochemical markers are quite convenient in evaluating the prognosis and diagnosis of bovine melanomas.

Keywords: Bovine, immunohistochemistry, melanoma, prognosis.

Sığır melanomlarında S100, Vimentin, PCNA, p53 ve MMP-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Özet: Bu çalışmada, sığır melanomlarının agresifliğini ve tanısı için PCNA, p53, MMP-9, Vimentin ve S100 ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın materyali bölümümüze getirilen 10 sığırdan alınan melanom biyopsi örneklerinden oluşmuştur. Sığırlardan alınan doku örnekleri, %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Rutin prosedürlerden sonra hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Ağartma için bazı ağır pigmentli tümör kesitleri deparafinize edildi, hidratlandı ve % 10'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi içinde 65°C'de 5 saat süreyle, kesitler berrak hale gelene kadar inkübe edildi ve kesitlere histopatolojik değişikliklerin tespit edilmesi için Hematoksilin & Eozin (H&E) boyaması yapıldı. Kesitler ışık mikroskobu altında incelendi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal yöntem olarak Avidin-Biotin Peroksidaz yöntemi kullanıldı. Tümöral kitlenin soliter, sert, tüysüz, oval-yuvarlak şekilli ve oldukça büyük olduğunu gözlemledik. Sitoplazmalarında çok sayıda büyük kahverengimsi siyah granüler melanin pigmenti içeren işsi ve epitelioid tipi tümör hücrelerini tespit ettik. Tüm melanom vakaları S100, Vimentin, PCNA, p53 ve MMP-9 ekspresyonları için immün pozitif. Sonuç olarak, bu immünohistokimyasal belirteçlerin sığır melanomlarının prognozunda ve teşhisinde oldukça kullanışlı olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: İmmünohistokimya, melanom, prognoz, sığır.

Introduction

A common consensus of the terminology in denomination of melanocytic tumors in both human and veterinary medicine has not been determined (Smith et al., 2002). Melanoma is the term used for all malignant melanocytic tumors, while melanocytoma refers to benign tumors (Madheswaran et al., 2019). Melanocytic neoplasms are common in dogs, gray horses and cats, they are

rarely observed in large animals such as cattle (Bhadaniya et al., 2015; Vijayakumar et al., 2020). Melanocytomas, like in melanomas, is very rare in cattle (Madheswaran et al., 2019). Melanomas originate from neuroectodermal melanoblasts or melanocytes, which would have migrated initially through epidermal-dermal junctions of skin, follicles, and then to dermis during embryonic

development and constitute approximately 2% of all bovine tumors (Vadalia et al., 2016; Beytut, 2018). Melanocytic tumors may form in red, gray or black-skinned cattle under two years of age, or some of these tumors may be congenital (Javanbakht et al., 2014). There is no breed or gender predisposition for melanomas. However, the incidence of melanomas is high in Aberdeen Angus (Garma-Aviña et al., 1981). While tumors are mostly localized in the jaw, maxilla, trunk, udder, prepuce, lips, they are rarely detected in the interdigital areas or eyes (Chandrashekaraiyah et al., 2014; Javanbakht et al., 2014). Regardless of whether these tumors are caused by chemical carcinogens or by ultraviolet rays, melanomas of all species exhibit similar biological characteristics due to their frequent recurrence and tendency to metastasize to regional lymph nodes (Babić et al., 2009). Melanomas are classified according to the dominant cell types as follows; epithelioid, spindle cell melanomas, whorled or dendritic type (Brito et al., 2009). Melanomas are mostly solitary and rarely seen in multiple foci and frequently metastasize to regional lymph nodes and organs such as lungs, spleen and liver (Mesarić et al., 2002). Tumor diagnosis is made by histological and cytological evaluations and the presence of melanin pigment is an important parameter for diagnosis (Beytut et al., 2018; Madheswaran et al., 2019).

S100 protein is an effective marker for diagnosing melanocytic tumors of humans and animals, although its functions in melanogenesis are not fully known (Ramos-Vara et al., 2011; Ramos-Vara et al., 2014; Sabattini et al., 2018). Vimentin is an intermediate filament that is expressed from mesenchymal and neuroectodermal cells in normal tissues. Tumor markers such as S100 together with vimentin are used to provide the gold standard in the diagnosis of malignant melanomas (Koenig et al., 2001; Ozyildiz et al., 2012). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a 36 kD nuclear polypeptide, expressed mainly in the S-phase in the proliferating cell cycle, which is a key factor for control of DNA duplication and cell division, therefore there is a positive correlation between PCNA expression and cell proliferation activity (Roels et al., 1999; Qin et al., 2017). Matrix metalloproteinases (MMPs) have been noted to perform functions such as degradation of the extracellular matrix (ECM), stimulating neoangiogenesis, inhibiting macrophage activity and migration, and activating the migration of tumor cells, and their expression is increased in many malignant tumors, including invasive skin melanomas (Aksenenko and Ruksha, 2013; Schmid et al., 2019). p53, which is a tumor suppressor gene, is involved in inhibiting the G1 / S phase of the cell

proliferation cycle, and as a result of any mutation or deficiency in this gene, the cell cycle is not blocked and the mutations increase gradually, thus accelerating the selection of neoplastic clones and tumor development (Roels et al., 2000; Roels et al., 2001).

In this study, it was aimed to evaluate the expression of PCNA, MMP-9, p53, Vimentin and S100 immunohistochemically to determine the aggressiveness and diagnosis of bovine melanomas.

Materials and Methods

Animals: The material of this study consisted of melanoma biopsy samples taken from 10 cattle brought to our department.

Ethical Approval: The ethics committee report of this study was obtained from Kafkas University Animal Experimentals Local Ethics Committee (Authorization number: KAU-HADYEK-2020/163).

Histopathological Investigations: Tissue samples from cattle were fixed in 10% buffered formalin solution. After routine procedures paraffin blocks were cut to sections of 5 µm thickness. For bleaching, some heavily pigmented tumor sections were deparaffinized, hydrated, and incubated in 10% solution of hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 hours at 65°C until sections appeared clear and Hematoxylin & Eosin (H&E) staining was applied to the sections in order to detect histopathological changes. Sections were examined and photographed under a light microscope.

Immunohistochemical Investigations: Avidin-Biotin Peroxidase method was used as immunohistochemical staining. For immunohistochemical staining, the sections of 4 µm in thickness taken to poly-L-lysine coated slides were deparaffinized and rehydrated in graded alcohols. In order to prevent endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide solution in Phosphate Buffered Saline (PBS) for 15 minutes. For antigen retrieval, the sections were boiled in Citrat Buffer Solution (pH 6) for 25 min in the microwave oven (at 800 watt). To prevent nonspecific staining, the sections were incubated for 10 min with non-immune serum (Thermo Scientific Histostain-Plus IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF: TP-125-HL) at room temperature. Diluted antibodies (Vimentin: Thermo Fisher Scientific, SP-20, ready to use, S100: Thermo Fisher Scientific, 4C4.9, ready to use, PCNA: Santa Cruz, sc-56, Dilution Ratio: 1:100, MMP-9: Santa Cruz, sc-393859, Dilution Ratio: 1:100, p53: Novus Bio, SPM590, Dilution Ratio:1:200) were incubated for overnight (+ 4 °C in the refrigerator). The sections were washed 3 times in PBS solution for 5 minutes, and the biotinylated secondary

antibody (Thermo Scientific, Histostain-Plus IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF: TP-125-HL) was applied to them at room temperature for 10 minutes. After washing in PBS (3-5 min), all sections were incubated with peroxidase-bound Streptavidin (Thermo Scientific, Histostain-Plus IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF: TP-125-HL) for 10 minutes at room temperature. A solution of 3,3-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) (Thermo Scientific, REF: TA-125-HD) was used as a chromogen for 15 minutes. The sections were treated with Mayer's Hematoxylin for 30 seconds and washed in running water for 5 min. The sections incubated with AEC (Thermo Scientific, REF: TA-060-SA) were covered with a special transparent adhesive without passing through alcohol and xylene. Primary antibodies were omitted from the negative control sections and were treated with diluted normal serum. The slides prepared after the covering were examined under a light microscope (Olympus Bx53) and photographed

via the Cell^P program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4). Analyzes of the images were done with Image J Program. Immunopositivity was evaluated using a semiquantitative grading scheme based on the number of cells exhibiting specific labeling for the Vimentin, S100, PCNA, MMP and p53 markers in 3 representative fields (40× objective): (+) mild labeling of 1%–10% of cells; (++) moderate labeling of 11%–59% of cells; and (+++) severe labeling of >60% of cells (Beytut et al., 2018).

Results

Macroscopical Results: We observed that the tumoral mass was solitary, firm, hairless, oval-round shaped and quite large. We found that the cross-sectional surfaces of melanomas are dark black in patches of brown. Besides, we detected the presence of hemorrhagic and ulcerated areas in places. (Figure 1 a-b).

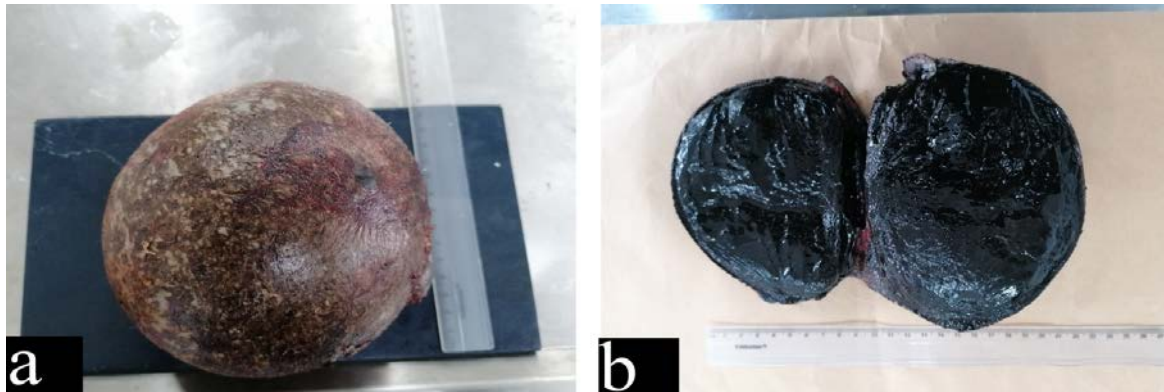


Figure 1. a: Macroscopic view of the tumoral mass, b: Severe dark black appearance on the cross-sectional face of the mass

Microscopical Results: In histopathological examinations, the presence of spindle and epithelioid shaped tumoral cells containing a lot of large brownish-black granular melanin pigments in their cytoplasm is spotted. Melanoma cells were arranged in layers in a band-like pattern especially

in the dermis. The nuclei of some tumoral cells were masked because of the excess pigment accumulated. We have demonstrated the existence of a few mitotic figures. Another important finding was that mononuclear cellular infiltrations were detected around some vessels (Figure 2 a-b).

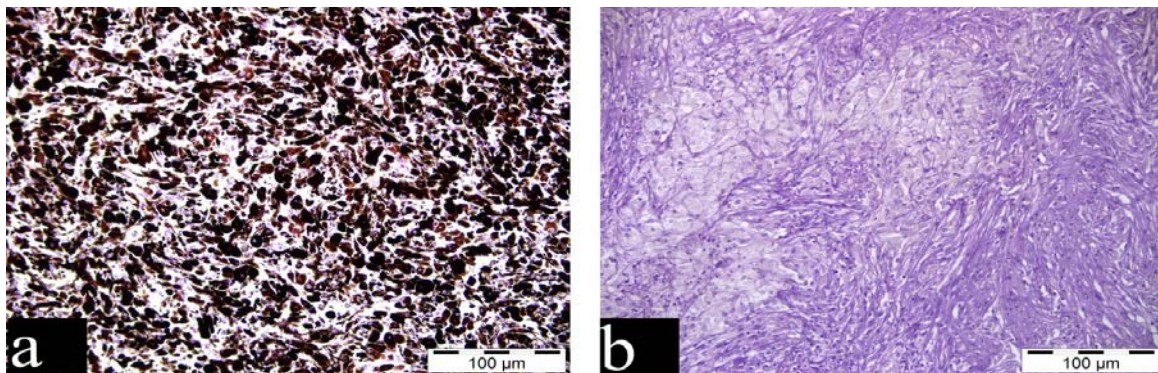


Figure 2. a: Tumor cells containing brownish to black melanin granules in their cytoplasm, unbleached, H&E, Bar=100 µm, b: Spindle and epithelioid cell type melanoma, bleached, H&E, Bar=100 µm.

Immunohistochemical Results: Information on the severity of S100, Vimentin, PCNA, p53 and MMP-9 expressions of all cases is given in Table 1. All melanoma cases were immune positive for S100, Vimentin, PCNA, MMP-9 and p53 expressions. Diffuse S100 immunoreactivity was detected especially in both the cytoplasm and nucleus of the epithelial type tumoral cells while varying degrees of vimentin immunoreactivity was detected in the cytoplasm of the spindle type tumoral cells. The expression of vimentin was moderate while the

expression of S100 was quite intense. We detected a dark red PCNA positive reaction in the nuclei of epithelial type neoplastic cells. We also observed mild MMP-9 positive reactions mostly in the cytoplasm of epithelial type neoplastic cells. In addition to cytoplasmic reactions, we also detected MMP-9 immunoreactivity in the nuclei of tumoral cells. We detected diffuse p53 expressions in the cytoplasm and nuclei of neoplastic epithelial and spindle type melanoma cells. (Figure 3 a-e).

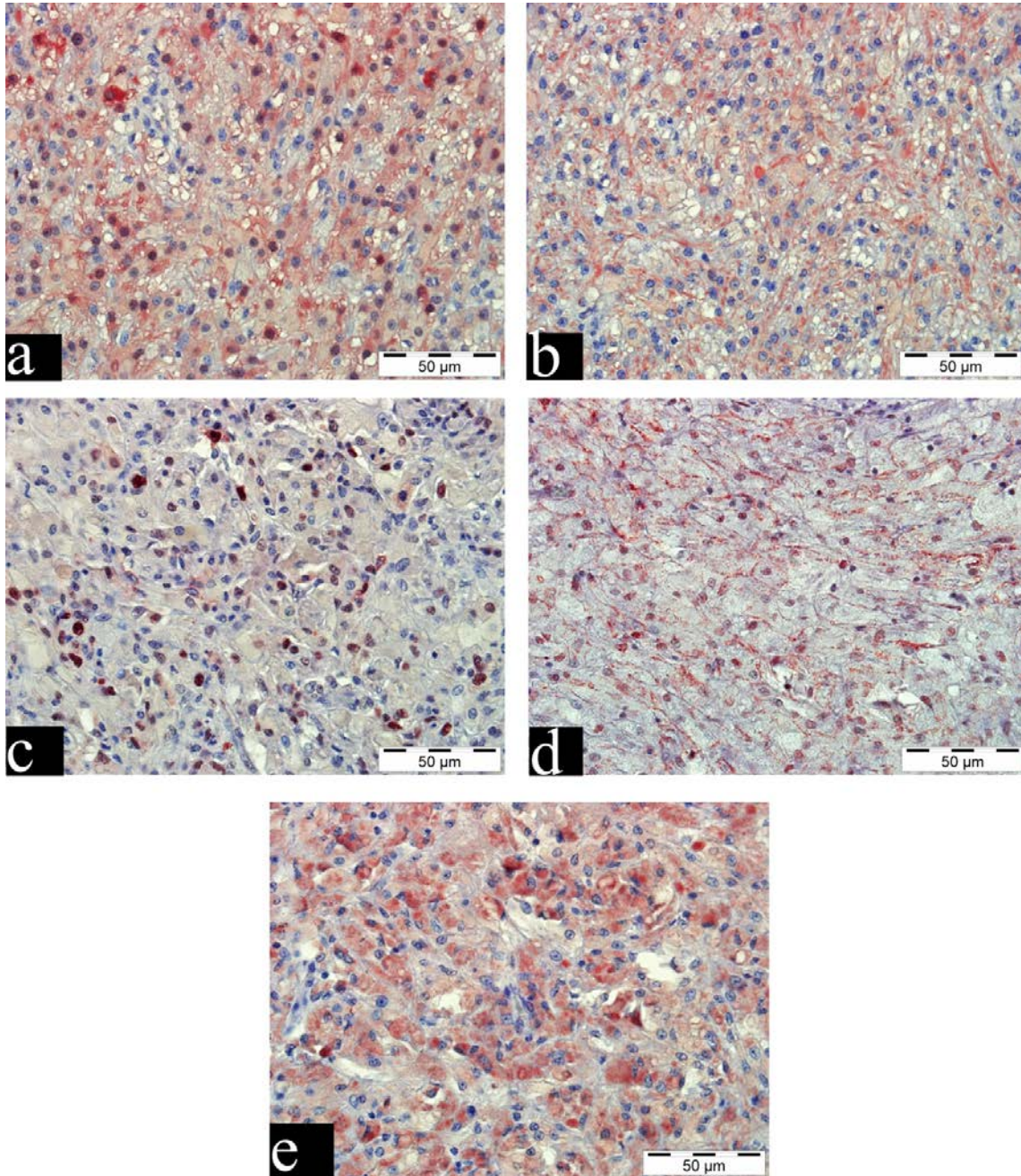


Figure 3. a: Strong S100 immunoreactivity in the cytoplasm and nucleus of the tumoral cells, IHC, Bar=50 µm, b: Moderate vimentin expressions in the cytoplasm of the tumoral cells, IHC, Bar=50 µm, c: Moderate PCNA positive reactions in the nuclei of tumor cells, IHC, Bar=50 µm, d: Moderate MMP-9 expressions in the cytoplasm and nucleus of the tumoral cells, IHC, Bar=50 µm, e: Diffuse p53 expressions in the cytoplasm and nucleus of the tumoral cells, IHC, Bar=50 µm.

Table 1. Information on the severity of S100, Vimentin, PCNA, p53 and MMP-9 expressions and metastasis status of all cases

Case No	S100	Vimentin	PCNA	p53	MMP-9	Metastasis
Case 1	+++	++	+++	+++	+	-
Case 2	+++	++	+++	+++	+	-
Case 3	+++	+++	+++	+++	+	-
Case 4	+++	++	+++	+++	+	-
Case 5	+++	++	++	+++	+	-
Case 6	+++	++	++	+++	+	-
Case 7	+++	++	+++	+++	+	-
Case 8	+++	+	+++	+++	+	-
Case 9	+++	++	++	+++	+	-
Case 10	+++	+++	+++	+++	+	-

Discussion and Conclusion

Diagnosis of melanomas is made based on of their typical macroscopic and microscopic features (Brito et al., 2009). In this study, we observed that the tumoral mass was solitary, firm, hairless, oval-round shaped and quite large following the literature data (Babić et al., 2009; Bhadaniya et al., 2015; Vijayakumar et al., 2020). We found that the cross-sectional faces of melanomas are dark black in patches of brown as reported by Madheswaran et al., 2019. Besides, we detected the presence of hemorrhagic and ulcerated areas in places similar to the literature (Sharma et al., 2010; Chandrashekaraiyah et al., 2014; Vadalia et al., 2016). Parallel to previous studies, in the histopathological examination of the melanomas, we detected spindle and epithelioid shaped tumoral cells containing a lot of large brownish-black granular melanin pigments in their cytoplasm (Beytut et al., 2018; Hemanth et al., 2014; Javanbakht et al., 2014; Pazhanivel et al., 2003). We also observed perivascular mononuclear cell infiltrations and mitotic figures as previously reported (Miller et al., 1995; Naveen et al., 2013; Sivadas et al., 1971).

We made Vimentin and S100 staining to achieve the diagnostic standard in bovine melanoma cases where we diagnosed melanoma according to their typical macroscopic and microscopic features. In this study, all melanoma cases were immune positive for S100 and Vimentin, similar to literature (Beytut et al., 2018; Javanbakht et al., 2014; Miller et al., 1995). We observed S100 expressions both in the nucleus and cytoplasm of neoplastic cells, similar to that reported by Javanbakht et al., 2014. According to literature (Beytut et al., 2018; Miller et al., 1995), we also detected positive immunoreactivity of the tumoral cells to vimentin. The fact that all cases were positive for S100 and Vimentin expressions made us think that these markers, although not very specific,

could be useful in the diagnosis of bovine melanomas (Beytut et al., 2018; Javanbakht et al., 2014).

Important parameters for the prognosis of the tumor in animals are the degree of pigmentation, PCNA expressions intensity, presence of necrosis, ulceration, inflammation, and p53 expression (Smith et al., 2002). To our knowledge, we could not find any studies in which PCNA, MMP-9 and p53 expressions were investigated immunohistochemically in bovine melanoma cases. Consistent with our results, PCNA immunoreactivity was reported in the nuclei of melanocytic tumoral cells in different types of animals such as horses, mice, cats and dogs (Qin et al., 2017; Roels et al., 1999; Roels et al., 2000). P53 mutations have been reported in approximately 20-40% of human melanoma cases (Smith et al., 2002). In veterinary medicine, Roels et al., 2000 detected strong diffuse p53 expression in six equine melanocytic tumors. They also noted that the severity of their expression was more severe in metastatic cases. In a different study, Roels et al., 2001 observed that in one feline case of malignant melanoma, p53 accumulation together with apoptosis was seen in three metastases. They reported that p53 index and apoptosis index are not directly correlated to survival. According to the literature (Roels et al., 2000; Roels et al., 2001) we also detected diffuse p53 expressions in the cytoplasm and nuclei of melanoma cells. In our study, PCNA and p53 expressions were quite severe, we concluded that bovine melanomas exhibited a rather aggressive character in line with these data. Melanomas frequently metastasize to regional lymph nodes and distant organs such as lungs, spleen and liver (Mesarić et al., 2002). Melanoma progression and metastasis consist of a multi-step process initiated by genetic changes, leading to modulation of cell-cell interactions, whereby tumoral cells can separate from the primary lesion, pass through the ECM and enter the microvasculature and spread

through the bloodstream (Schmid et al., 2019). Aksenenko and Ruksha 2013 suggested that MMP-9 is involved not only in the regulation of ECM, but also in the processes of cell proliferation and neoangiogenesis in skin melanoma. Schmid et al., 2019 reported that canine oral primary melanoma cells showed weak MMP-9 expression. In this study, we also observed mild MMP-9 positive reactions in the cytoplasm and nuclei of neoplastic cells as reported by Schmid et al., 2015. Also, no metastasis was observed in all cases in our study, and we found that mmp-9 expressions were quite weak in all cases. According to the data obtained from our study, we thought that MMP-9 might be effective in the metastasis capacity of melanomas. MMP-9 inhibitors can be used in the treatment of melanomas.

In conclusion, we could not find any literature study evaluating PCNA, p53 and MMP-9 expressions in bovine melanoma cases using immunohistochemical methods. In this respect, we hope that results obtained in our study will contribute to the literature. Besides, we think that these three markers are quite useful in evaluating the aggressiveness of bovine melanomas.

References

- Aksenenko MB, Ruksha TG, 2013: Analysis of the application of MMP-9 inhibitor in skin melanoma: experimental study. *Bull Exp Biol Med*, 154 (5), 594-596.
- Babić T, Grabarević Ž, Vuković S, Kos J, Matičić D, 2009: Congenital melanoma in a 3-month old bull calf - a case report. *Vet Arh*, 79 (4), 315-320.
- Beytut E, Kılıç E, Yayla S, 2018: Histopathological and immunohistochemical evaluation of congenital cutaneous melanomas in calves (3 cases). *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 65 (4), 425-432.
- Bhadaniya AR, Trangadia BJ, Prasad MC, Fefar DT, Kalaria VA, Vadaliya JV, Modi KS, 2015: Pathology of melanocytic tumour in cattle. *Indian J Vet Pathol*, 39 (3), 249-250.
- Brito MF, França TN, Jabour F, Seixas JN, Andrade G, Oliveira LI, Peixoto, P, 2009: Metastasizing oral melanoma in a cow. *Ciencia Rural*, 39 (4), 1236-1240.
- Chandrashekaraiyah GB, Ballari SV, Manjunatha K, Chavadhal N, Radder SK, 2014: Malignant melanoma in a Hallikar bullock. *Int J Vet Sci*, 3 (2), 65-67.
- Garma- Aviña A, Valli VE, Lumsden JH, 1981: Cutaneous melanomas in domestic animals. *J Cutan Pathol*, 8 (1), 3-24.
- Hemanth I, Amaravathi P, Anand Kumar A, Devaratnam J, Bharathi S, Sailaja N, Kamalakar G, Sasidhar Babu N, 2014: Cutaneous melano-fibroma in a bullock – a rare concurrence of melanoma and fibroma. *Int J Sci Environ Technol*, 3 (2), 659-662.
- Javanbakht J, Sasani F, Adibhashemi F, Hemmati S, 2014: Comparative histopathological diagnosis of cutaneous melanoma by H&E, special staining and immunohistochemical methods against cutaneous squamous cell carcinoma in horse and bovine. *J Bioanal and Biomed*, 6 (4), 19-23.
- Koenig A, Wojcieszyn J, Weeks BR, Modiano JF, 2001: Expression of S100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol*, 38 (4), 427-435.
- Madheswaran R, Shahana S, Gopal K, Sankar P, 2019: A case report of non-systemic highly aggressive melanoma in a cow. *Indian J Vet Pathol*, 43 (2), 124-126.
- Mesarić M, Zadnik T, Cerne M, 2002: Malignant melanoma in a cow. *Acta Vet-Beograd*, 52 (1), 59-64.
- Miller MA, Weaver AD, Stogsdill PL, Fischer JR, Kreeger JM, Nelson SL, Turk JR, 1995: Cutaneous melanocytomas in 10 young cattle. *Vet Pathol*, 32 (5), 479-484.
- Naveen B, Chandrashekar M, Vishwaradhya TM, Shambulinga M, Kumar P, Singh D, Rao S, 2013: Malignant melanoma in indigenous cattle - a case report. *Haryana Vet*, 52, 135-136.
- Ozyildiz Z, Ceylan C, Yilmaz R, Ozsoy SY, 2012: Immunohistochemical characterization of perineal melanoma in Kilis goats. *Biotech Histochem*, 87 (6), 408-412.
- Pazhanivel N, Ezakial Napoleon, Murali Manohar B, Ravi U, 2003: A case of cutaneous melanoma in a bull. *Indian J Anim Res*, 37 (2), 151-152.
- Qin J, Li S, Zhang C, Gao DW, Li Q, Zhang H, Jin XD, Liu Y, 2017: Apoptosis and injuries of heavy ion beam and x-ray radiation on malignant melanoma cell. *Exp Biol Med (Maywood)*, 242 (9), 953-960.
- Ramos-Vara JA, Frank CB, DuSold D, Miller MA, 2014: Immunohistochemical expression of melanocytic antigen PNL2, Melan A, S100, and PGP 9.5 in equine melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*, 51 (1), 161-166.
- Ramos-Vara JA, Miller MA, 2011: Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with Melan A. *Vet Pathol*, 48 (2), 443-450.
- Roels S, Tilmant K, Ducatelle R, 2001: p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. *Res Vet Sci*, 70 (1), 19-25.
- Roels S, Tilmant K, Ducatelle R, 1999: PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol*, 121 (1), 13-24.
- Roels S, Tilmant K, Van Daele A, Van Marck E, Ducatelle R, 2000: Proliferation, DNA ploidy, p53 overexpression and nuclear DNA fragmentation in six equine melanocytic tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 47 (7), 439-448.
- Sabattini S, Renzi A, Albanese F, Fantinati M, Rigillo A, Abramo F, Tornago R, Tortorella G, Massaro M, Pagano TB, Buchholz J, Bettini G, 2018: Evaluation of Ki-67 expression in feline non-ocular melanocytic tumours. *BMC Vet Res*, 14 (1), 309.
- Schmid F, Brodesser D, Reifinger M, Forte S, Semp P, Eberspächer-Schweda MC, Wolschek M, Brandt S,

- Kleiter M, Pratscher B, 2019: Canine oral primary melanoma cells exhibit shift to mesenchymal phenotype and phagocytic behaviour. *Vet Comp Oncol*, 17 (3), 211-220.
- Sharma S, Chaudhary RN, Singh K, 2010: Melanoma in a Haryana cow. *Haryana Vet*, 49, 78.
- Sivadas CG, Nair MK, Rajan A, Ramachandran KM, 1971: Congenital melanoma in a calf. A review and case report. *Br Vet J*, 127 (6), 289-293.
- Smith SH, Goldschmidt MH, Mcmanus PM, 2002: A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*, 39 (6), 651-678.
- Vadalia JV, Fefar DT, Patel PB, 2016: Surgical management of malignant melanoma in Kankrej cow. *Intas Polivet*, 17 (1), 98-99.
- Vijayakumar S, Lakkawar AW, Kumar R, Alphonse RMD, Nair MG, 2020: Pathomorphological studies on mesenchymal and melanocytic neoplasms of cattle. *VMPH*, 1 (3), 102-107.
- *Correspondence:** Emin KARAKURT
Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Pathology, Kars, Turkey,.
e-mail: mehmeteminkarakurt@hotmail.com

Alfa-proteobacteria Grubuna Ait Bazı Bakteri Cinslerinden İzole Edilen Antijenlerin Brusellozisin Serolojik Tanısında Potansiyel Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Ahmet Selman Mızraklıdağ^{1,a}, Sevil Erdenliğ Gürbilek^{2,b,*}

¹Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.

²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye.

^aORCID: 0000-0002-8593-8529, ^bORCID:0000-0002-0377-2650

Geliş Tarihi: 09.02.2021

Kabul Tarihi: 31.05.2021

Özet: Brusellozis insanlarda ve hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan, halk sağlığını tehdit eden ve hayvancılık endüstrisine ciddi ekonomik kayıplara neden olan zoonoz bir enfeksiyondur. Bu çalışmada, *Brucella* suşları ile filogenetik yakınlığı bulunan alfa-Proteobacteria sınıfına ait *Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium* ve *Rhizobium tropici* türlerinden hazırlanan antijenlerin brusellozisin serolojik tanısında *Brucella* antijeni yerine kullanılıp kullanılmayacağına ortaya konulması amaçlandı. Çalışmada, test serumlarına pozitif ve negatif kontroller ile birlikte indirekt ELISA uygulandı. Sonuç olarak, sığır ve insan brusellozisi açısından test edilen antijenlerin hiçbirisi güvenilir düzeyde sensitivite ve spesifite göstermedi. Çalışmada, sadece R-LPS taşıyan *O. intermedium* antijeni ile ve sadece koyun ve köpeklerde kısmen kabul edilebilir sınırlarda bir tanılama performansı alındı. Sonuç olarak, proteobakterilerin α -2 alt grubunda yer alan mikroorganizmaların brusellozisin indirekt teşhisinde bazı çapraz reaksiyonlara neden olabileceği ve bu durumun yanlış pozitiflik yaratabileceği saptandı. Öte yandan bu grup bakterilerden hazırlanan daha saf antijenlerin, *B. canis* ve *B. ovis* enfeksiyonlarında kullanıma potansiyeli bulunabileceği ve bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Alfa-Proteobacteria, *Brucella*, Seroloji.

Evaluation of Potential Usage of Antigens Prepared from Some Bacterial Genera of Alpha-Proteobacteria in Serologic Diagnosis of Brucellosis

Abstract: Brucellosis is an important zoonosis that cause serious infections in man and animals. This infection constitutes a risk for public health and big economical losses in animal industry. Serological tests have been intensively used for serologic diagnosis of brucellosis because these tests are quicker and more practical than culturing of the causative organisms. Antigens used in serological tests are prepared from virulent *Brucella* strains. In this regard, to use antigens prepared from bacterial strains that are not virulent for human and genetically close to *Brucella* spp. in the serological diagnosis of the disease will be a desired approach. These organisms have much lower virulence than *Brucella* and generally they are considered as saprophytic bacteria and some of them are opportunistic pathogen like *O. anthropi*. In this study, we planned to search the possibility of usage of antigens prepared from three bacterial species of alpha-Proteobacteria (*Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium*, *Rhizobium tropici*) which are filogenetically close to *Brucella*. As conclusion, none of the antigens yielded acceptable sensitivity and specificity for cattle and human brucellosis. Only sheep and dogs sera against *O. intermedium*, which is a rough species and carry R-LPS instead of S-LPS, showed diagnostic performance in acceptable ranges. When considering all the results of the study, it was thought that some members of alpha Proteobacteria might cause cross reaction in the serologic diagnosis of brucellosis and cause false positive reactions and this should be remembered when evaluating the serologic diagnosis of brucellosis. On the other hand, pure antigens from *O. intermedium* might have the potential to be used in *B. ovis* and *B. canis* infections and it was thought that the future works in this field might be needed.

Keywords: Alpha-Proteobacteria, *Brucella*, Serology.

Giriş

Filogenetik açıdan *Brucella* türleri, *Rhizobiaceae* grubunun *Ochrobactrum* ve *Rhizobium* genuslarının da içinde yer aldığı *Proteobacteria* sınıfının α -2 alt grubunda yer almaktadır. *Brucella* türleri arasındaki DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla türler

arasında %90'dan fazla DNA homolojisinin olduğu saptanmıştır (Vizcaino ve ark., 2000). DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarında *Ochrobactrum* genusunun *O. anthropi* ve *O. intermedium* olarak iki türe ayrıldığı bildirilmiştir. *O. intermedium*'un

Brucella genusuna, *O. anthropi*'den daha fazla genetik ve antijenik benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Velasco ve ark., 1997; Velasco ve ark., 1998). Bu benzerlik, bazı araştırmacıları biyogüvenlik sağlama açısından, *Brucella* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan antijenlerin yerine bu benzer *Proteobacteria* cinslerindeki bakterilerden elde edilen antijenlerin kullanılma olasılığı ile ilgili çalışmalara yöneltmiştir. Zira önemli bir zoonoz olan brusellozis tanısında kültür yöntemi, zaman alıcı ve laboratuvar personeli için enfeksiyon riski taşımaktadır. Ancak serolojik testler için hazırlanan antijenler virulent *Brucella* suşlarından hazırlanmakta ve bu suşlar ile çalışan laboratuvar personeli için bir risk oluşturmaktadır. Delpino ve ark. (2004), *O. anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Sinorhizobium meliloti* kökenli sitosolik ve membran antijenleri ile brusellozisi insan, sığır, köpek ve koyun serumlarının ELISA reaktivitesini değerlendirmişler ve *B. canis* ile infekte köpeklerde *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* ve *Ochrobactrum* için sırası ile %58, %88 ve %84 sensitivite elde ettiklerini açıklamışlardır. Araştırmacılar sağlıklı insan, sığır ve koyun serumlarının bu antijenlere yüksek reaksiyon göstermesi nedeniyle, *O. anthropi*, *A. tumefaciens* ve *S. meliloti* orijinli sitosolik ve membran protein antijenlerinin *Brucella* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların indirekt teşhisinde insan, sığır ve koyunlarda tanısız bir fayda sağlamadığını bildirmişlerdir. Da Costa (1996) ve Cloeckart ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada *Brucella* dış membran lipoproteinleri *Omp 10*, *Omp 16* ve *Omp19'a* yönelik spesifik monoklonal antikörlerin çoğunun ELISA'da *O. anthropi* (LMG 3331), *O. intermedium* (LMG 3301) ve *Phyllobacterium rubiacearum* ile kuvvetli çapraz reaksiyon verdiklerini, bu yanıtın *Rhizobium* ve *Agrobacterium* için daha zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Ancak monoklonal antikörlerin hiçbiri S-LPS ile çapraz reaksiyon veren *Yersiniaenterocolitica*, *Escherichia coli* O:157 veya *Salmonella* Urbana gibi bakterilerle çapraz reaksiyon vermemiştir.

Aras ve Uçan (2008), *R. tropici* ile pleyt test antijeni hazırlamışlar ve *Brucella* ile enfeksiyon olma şüphesi olan sürülerden 100 koyun ve sığır serumunu hazırladıkları antijen ve *B. abortus* S99 suşundan hazırlanmış Rose-Bengal pleyt test (RBPT) antijeni ile aglütinasyon yönünden test etmişlerdir. *Brucella* serum tüp aglütinasyon (SAT) antijeni ile yapılan aglütinasyon testini gold standart olarak kabul ettiklerinde, *R. tropici* antijeninin koyunlarda sensitivite ve spesifitesini sırası ile %80,1 ve %59,5; sığırlarda %81,1 ve %22,6 olarak bulmuşlardır. Bu bulguların ışığında *R. tropici* tüm hücre antijeni ile yapılan aglütinasyon testinin sığır ve koyunlarda brusellozis serolojik tanısında kullanılmayacağını, ancak bu hayvanların *R. tropici*'ye karşı antikör

geliştirdiklerinden yanlış pozitiflik yönünden göz önünde bulundurulmaları gerektiğini bildirmişlerdir.

Son yıllarda *O. anthropi*'nin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlarda artış olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyonlar her ne kadar immunsupresif hastalarda (organ transplantı, AIDS ve kanser hastaları gibi risk grupları) daha sık görülse de immün sistemi baskılanmamış kişilerde de bu mikroorganizmanın etken olduğu farklı klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir (Holmes ve ark. 1998; Xu ve ark. 2003; Vila ve ark., 2016).

Bu çalışmada, *Brucella* genusunun en yakın akrabası olan alfa-*Proteobacteria* grubundaki *Rhizobium* ve *Ochrobactrum* genuslarında bulunan bakterilerden elde edilen antijenlerin; insan, sığır, koyun ve köpek brusellozisinin indirekt teşhisinde kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmanın etik kurul raporu, Dolvet Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Yetki numarası: 2016/7) alınmıştır.

Bakteriyel Suşlar: Çalışmada kullanılan *Ochrobactrum anthropi* (LMG 3331: ATCC muadili 49188'dir) ve *Ochrobactrum intermedium* (LMG 3301) standart suşları ve *B. abortus* S99 suşundan elde edilmiş smooth lipopolisakarit (S-LPS) antijeni Animal Plant Health Agency (APHA) (Hayvan Bitki Sağlığı Ajansı), Weybridge, İngiltere'den temin edilmiştir. *Rhizobium tropici* standart suşu ise Selçuk Üniversitesi Prof. Dr. Uçkun Sait UÇAN tarafından temin edilmiştir. *B. abortus* S99 standart antijen suşu Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunmaktadır.

Serum Örnekleri: Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Serum Bankası'nda bulunan, daha önceki çalışmalarda kullanılmış ve brusellozis yönünden doğruluğu kültür ile doğrulanmış 30 sığır, 24 koyun, 22 köpek ve 20 insan serumu, çalışmada *Brucella* antijeni ile birlikte diğer test antijenlerinin ELISA ile değerlendirilmesinde, pozitif kontroller olarak kullanıldı. Aynı şekilde brusellozis yönünden negatif anamnezi olan ve klasik serolojik yöntemlerle negatif bulunan 17 sığır, 23 koyun, 25 köpek ve 27 insan serumu çalışmada, her bir test antijeni için eşik değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Antijen Üretimi: Antijen olarak tüm test suşlarından ham LPS izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, Yi ve Hackett (2000) tarafından bildirilmiş olan tri-reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. Kısaca, test suşları serum dekstroz agar (SDA)'da üretildikten sonra, üreyen koloniler PBS ile toplanarak su banyosunda 80°C'de 90 dakika bekletilerek inaktive edildi. Bakteri süspansiyonu, +4

°C'de 3.500 rpm'de santrifüj edilerek, üstteki besiyeri uzaklaştırıldı ve alttaki bakteri pelleti toplandı. Toplanan her bir gram bakteri pelleti için 2 ml tri-reagent kullanıldı. Karışım oda ısısında 10-15 dakika tam bir homojenizasyon için bekletildi. Bu sürenin sonunda, faz seperasyonu yaratmak için her bir gram bakteri pelleti için karışıma 200 µl kloroform eklendi. Süspansiyon vortekste hızlıca karıştırılarak 10 dakika daha inkübe edildi ve daha sonra 12.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Böylece su ve organik fazlar ayrıldı. Su fazı yeni bir ependorf tüpe transfer edildi. Organik fazın üstüne 100 µl distile su eklendi ve karışım tekrar 12.000 g'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Su fazı bir önceki su fazı ile kombine edildi ve elde edilen bu tri-reagent ile ekstrakte edilen LPS çözeltisi, -20 °C'de muhafaza edilen %95'lik etanol içinde hazırlanan 0.375 M magnezyum klorid ile karıştırıldı. Bu karışım 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet 200 µl distile su içinde süspanse edildi. Daha sonra küçük miktarlarda steril PCR tüplerine taksim edilerek -20 °C'de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

İndirekt ELISA (i-ELISA): Çalışmada kullanılacak her bir ELISA antijeni için, kullanılacak antijen ve konjugatın optimum dilüsyonları belirlendi. Bunun için karşılıklı titrasyonlar (checkerboard) yapıldı. ELISA solid faz antijeni 0.1 µg/kuyucuk olacak şekilde 0.05 M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solüsyonu içinde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı maxisorp polistiren pleytlere

(NUNC, 692620) blank (kör) kuyucuklar hariç diğer tüm kuyucuklarına 100 µl konuldu. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler +4 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ardından pleytler % 3'lük yağsız süt tozu içeren PBS solüsyonu ile 2 saat bloklandılar. Yıkama aşamasında pleytler %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Primer antikor bağlanması aşamasında, her hayvan türü için kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının her birinden ikişer kez olmak üzere %1 yağsız süt tozu içeren PBS/T solüsyonu içinde 1:50 oranında hazırlanmış olan dilüsyonlarından pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl konuldu. Pleytler oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Pleytler tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini belirlenen dilüsyonda tüm kuyucuklara 100 µl ilave edildi. İnkübasyonu ve yıkama aşamalarını takiben üzerine 100 µl substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H₂O₂) eklendi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H₂SO₄ ilave edilerek, ELISA okuyucuda (VERSAmax 3.13/B2573), 490 nm'de okundu. Her bir ELISA modeli için eşik değeri negatif kontrollerin OD değerlerinin ortalaması artı 2 standard sapma olarak belirlendi.

Sensitivite ve Spesifisite Saptanması: Her bir antijenin her bir konakçı türü için sensitivite ve spesifisitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Sensitivite = $\frac{\text{Brusella pozitif serumlar}}{\text{Brusella pozitif serumlar} + \text{Yanlış negatifler}}$

Spesifisite = $\frac{\text{Brusella negatif serumlar}}{\text{Brusella negatif serumlar} + \text{Yanlış pozitifler}}$

Bulgular

O. anthropi, *O. intermedium*, *R. tropici* ve *B. abortus* S99 suşlarından elde edilen ham lipopolisakkarit (LPS)'e karşı koyun, inek, insan ve köpeklerin *Brucella* (+) ve *Brucella* (-) serumları ile yapılan i-ELISA'da elde edilen OD değerlerinin aritmetik ortalaması Tablo 1'de sunulmuştur. Alınan sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, antijenlere karşı ortaya çıkan serolojik reaksiyon, homolog bakteri antijeni ile karşılaştırıldığında heterolog bakteri antijenleri için düşük bulundu. Ancak *Brucella* dışındaki diğer bakteriler kendi aralarında karşılaştırıldığında, en kuvvetli serolojik reaksiyonu insanlardaki sonuçlar hariç, *O. intermedium* gösterdi. Brusellozisin serolojik teşhisinde, testin tanısıl performansı pozitif ve negatif serumlar arasındaki OD farkına bağlı olduğundan, yine *O. intermedium* koyunlarda ve köpeklerde bu farkın diğerlerine göre en fazla olduğu bakteri olarak belirlendi.

Her bir ELISA için eşik değeri sağlıklı insan/hayvanlardan elde edilen OD değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir tür için değerlendirildiğinde, test antijenlerinin koyun, insan, sığır ve köpek brusellozisinin tanısında vermiş olduğu sensitivite ve spesifisite değerleri sırası ile Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4 ve Tablo 5'de sunuldu.

Tartışma ve Sonuç

Brucella türleriyle bazı alfa-*Proteobacteria* üyeleri arasında yakın genetik ve antijenik yakınlık olduğu, bu yakınlığın çeşitli serolojik testlerde çapraz reaksiyonlar olarak da ortaya konulduğu birçok kaynakta bildirilmektedir (Aras ve Uçan, 2008; Delpino ve ark., 2004; Ducrotoy ve ark., 2018; Velasco ve ark., 1997; Velasco ve ark., 1998). Çoğu *Brucella* türünün yüksek patojenik potansiyeline karşılık, çoğu alfa-*Proteobacteria* sağlıklı bireyler için ya patojenik değildir ya da çok sınırlı bir patojenite göstermektedir. Özellikle *O. anthropi* ile immün

yetmezliği olan bazı hastalarda infeksiyonlar oluşturmadığı bildirilmektedir (Xu ve ark., 2003). bildirilse de sağlıklı bireyler için bir risk

Tablo 1. Test edilen antijenlerin canlı türlerindeki i-ELISA'ya ait OD değerleri

	KOYUN (+)	KOYUN (-)	İNEK (+)	İNEK (-)	İNSAN (+)	İNSAN (-)	KÖPEK (+)	KÖPEK (-)	BLANK	BLANK
A	0,5383	0,1969	0,4267	0,7821	0,5700	0,5743	0,5291	0,4380	0,0418	0,0436
İ	1,0019	0,3864	0,7517	0,5288	0,2997	0,2245	0,6728	0,2636	0,0422	0,0525
T	0,5809	0,1977	0,2512	0,6785	0,3455	0,2553	0,3432	0,4229	0,0420	0,0403
B	2,4027	0,5221	2,1950	0,4637	2,1607	0,3313	1,0663	0,3981	0,0410	0,0422

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Tablo 2. Koyun brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	Koyun (+)	Koyun (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5383	0,1969	0,386	42	92
İ	1,0019	0,386	0,546	71	84
T	0,5809	0,1977	0,369	40	100
B	2,4027	0,5221	0,682	92	92

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Tablo 3. İnsan brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	İnsan (+)	İnsan (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5700	0,5743	0,687	0	100
İ	0,2997	0,2245	0,365	0	100
T	0,3455	0,2553	0,398	0	100
B	2,1607	0,3313	0,513	100	93

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Tablo 4. Sığır brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	İnek (+)	İnek (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,4267	0,7821	0,945	0	100
İ	0,7517	0,5288	0,648	0	100
T	0,2512	0,6785	0,823	0	100
B	2,1950	0,4637	0,578	100	100

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Tablo 5. Köpek brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	Köpek (+)	Köpek (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5291	0,4380	0,521	7,3	100
İ	0,6728	0,2636	0,332	69	78
T	0,3432	0,4229	0,512	0	100

B	1,0663	0,3981	0,497	76	85
---	--------	--------	-------	----	----

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Ortak antijenik determinatlardan kaynaklanan çapraz reaksiyonlar, bazı önemli bakteriyel enfeksiyonların indirekt teşhisinde önemli sorunlara neden olmaktadır. Ancak çapraz reaksiyon veren türlerden biri patojenik değilse, bu çapraz reaksiyonun patojen olanın oluşturduğu enfeksiyonun saptanması noktasında tanısıl bir yararı olabilir. Bu hipotezden hareketle bu çalışmada, *Brucella* türleriyle enfekte olmuş insan ve hayvanlardan alınan, doğrulanmış pozitif serumlar ve sağlıklı birey ve hayvanlardan alınan negatif kontrol serumları, *O. anthropi*, *O. ntermedium*, *R. tropici* ve *B. abortus* S99 suşlarından elde edilen ham LPS antijenlerine karşı in house indirekt ELISA ile test edildi. Çalışma rough ve smooth suşlardan hazırlanan antijenler ile yapıldığından, sadece smooth *Brucella* suşları ile değil, rough suşlar olan *B. ovis* ve *B. canis* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılma kapasiteleri de araştırıldı. Ayrıca testlerin validasyonunda sadece sığır ve koyun değil, köpek ve insanlardan alınan serumlar da kullanıldığından, hastalığın serolojik tanısında alfa-*Proteobacteria* grubundaki 3 ayrı bakterinin kullanılması çok geniş kapsamlı olarak değerlendirildi.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, *Brucella*-enfekte serumlar ile test edilen alfa 2 *Proteobacteria* üyeleri düşük reaktivite gösterdi. Oysa, Velasco ve ark. (1997), *B. melitensis* ve *O. anthropi* kökenli sitosolik proteinlerin ve membran antijenlerinin çok geniş çaplı çapraz reaksiyon verdiklerini bildirmişlerdir. Bunun yanında, az oranda çapraz reaksiyonun dış membran proteinleri (OMPs) ve LPS (sadece kor ve lipid A bölgesi) seviyesinde de ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bunun nedeni çalışmamızda kullandığımız antijenin ham olmasına rağmen, yani bir miktar OMPs taşımaya rağmen büyük oranda LPS tabakası olmasıdır. Çalışmada protein yerine LPS antijeninin seçilmesinin nedeni, smooth *Brucella* türlerine maruz kaldıktan sonra gelişen serolojik yanıtın büyük bir oranda S-LPS tabakasına karşı olmasıdır. Ayrıca S-LPS'ye karşı oluşan antikorlar bugün için kullanılan standard serolojik testlerin temelini oluştururlar (Aras ve Uçan, 2008). Çalışmada ham LPS antijenlerine karşı ortaya çıkan en yüksek serolojik reaksiyon, tahmin edilebileceği gibi *B. abortus* S99 ham LPS antijenine karşı saptandı. Bunu çok daha düşük yoğunlukta olmak üzere *O. ntermedium*, *O. anthropi* ve *R. ropici* antijenleri izledi. En yüksek reaksiyonun *O. intermedium* olması bu türün rough LPS taşıyor olması ile açıklanabilir. Çünkü R-LPS'de, S-LPS'den farklı olarak O-polisakkarit ya indirgenmiş ya da tamamen yıkılmış olabilir. Dolayısıyla R-LPS'de

daha geniş bir kor polisakkariti mevcuttur (Ducrotay ve ark., 2018). Ayrıca DNA hibridizasyon çalışmaları *O. intermedium*'un *Brucella* genusuna *O. anthropi*'den daha yakın olduğunu göstermiştir (Holmes ve ark., 1998). Velasco ve ark. (1998) tüm hücre ekstraktlarını kullanarak yaptıkları western blot analizinde, *O. anthropi* LMG3301'in (*O. intermedium*'un sinonimi) *Brucella* antijenlerine *O. anthropi* LMG 3331'den daha yakın olduğunu ve ayrıca yaptıkları konvensiyonel fenotipik karakterizasyon çalışmalarında da, bu yakınlığı saptadıklarını bildirmişlerdir. *O. intermedium*'un çalışmamızda daha yüksek reaktivite göstermesi, araştırmacıların bu bulguları ile uyum göstermektedir. Ayrıca, *O. intermedium*'un tür olarak koyun ve köpeklerde daha yüksek reaktivite vermesi, pozitif ve negatif kontrol serumları arasında bir fark oluşturmasının nedeni koyun ve köpeklerin rough türler olan *B. ovis* ve *B. canis*'in doğal konakçıları olmasına büyük oranda bağlı olabilir. Çalışmamızda koyun brusellozisinin tanısında *O. intermedium* ham LPS antijeninin kullanıldığı ELISA modelinin sensitivitesi %71, spesifisite ise %84 olarak bulundu. *R. tropici* ELISA modelinde ise sensitivite %40, spesifisite %100 olarak tespit edildi. Köpek brusellozisiyle ilgili olarak *O. intermedium* için sensitivite %69, spesifisite %78 olarak belirlendi. Uçan ve Aras (2008), koyunlarda *R. tropici* ile hazırlanan lam aglütinasyon testinde sensitiviteyi %80,1 ve spesifisiteyi %59,5 olarak bulmuştur. Sonuçların farklı çıkmasının nedeni, kullanılan testin ve kontrol serumlarının farklı olmasıyla ilgili olabilir. Zira çalışmada antijen olarak tüm bakteri değil onun bazı dış membran proteinlerini de içeren ham LPS tabakası ELISA ile test edildi. Ayrıca kullanılan serumlar pozitif ve negatifliği önceden teyit edilmiş serumlardı. Bütün bunlar alınan farklı sonuçların nedeni olabilir.

Sonuç olarak, sığır ve insan brusellozisi açısından test edilen antijenlerin hiçbiri istenilen düzeyde yüksek sensitivite ve spesifisite göstermedi. Bu türlerde kontrol serumları yüksek reaksiyon gösterdiklerinden eşik değeri çoğu zaman pozitif kontrol ortalamasının üstüne çıktı. Böylece spesifisite %100, sensitivite ise 0 veya 0'a yakın düzeyde belirlendi. Özellikle sığırlarda negatif kontrollerin *R. tropici* ve *O. anthropi* için yüksek OD değeri göstermesi, bu hayvanların çoğu bitki patojeni ve toprak bakterisi olan bu türlere fazlaca maruz kalmış olmalarıyla ilgili olabilir. İnsanlarda *B. abortus* dışındaki tüm bakteri türleri negatif kontrollere genel olarak düşük bir reaktivite gösterdi. Bu durum, insanların söz konusu bitki

patojenleriyle düşük düzeyde temas halinde olmasıyla açıklanabilir.

Çalışmada, sadece rough bir tür olan ve dolayısı ile S-LPS yerine R-LPS taşıyan, O-polisakariti ya indirgenmiş ya da tamamen yıkılmış olan *O. intermedium* antijeniyle, sadece koyun ve köpekte kısmen kabul edilebilir sınırlarda bir tanısal performans alınmıştır. Bu grup bakteri antijenlerinden alınan sonuçlar *Brucella* antijenleri ile benzer sonuçlar alınmış olsaydı, biyogüvenlik açısından neredeyse risk oluşturmayan bu bakteriler ile antijen üretimi yapılabilecekti.

Çalışmada alınan tüm sonuçlar dikkate alındığında, proteobakterilerin α -2 alt grubunda yer alan mikroorganizmaların brusellozis serolojik tanısında birtakım çapraz reaksiyonlara neden olabileceği ve bu durumun yanlış pozitiflik yaratabileceği akılda tutulmalıdır. Ancak brusellozis serolojik teşhisinde kullanılan antijenler tüm bakteriden hazırlandıkları için, daha ziyade anti-LPS antikörlerini saptayacağından, rough olmayan α -2 proteobakterilerin yanlış pozitiflik için fazla bir sorun yaratacağı düşünülmektedir. Öte yandan bu grup bakterilerden hazırlanan daha saf antijenlerin, *B. canis* ve *B. ovis* infeksiyonlarında kullanıma potansiyelini artırabileceği ve bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16148 proje numarası ile Yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir. Destekleri için kuruma teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Aras Z, Uçan US, 2008: *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* Enfeksiyonlarında Oluşan Antikorların *Rhizobium tropici* Antijeni ile Tesbit Edilmesi. *Vet Bil Derg*, 24 (1), 47-52.

Cloekaert A, Tibor A, Zygmunt SM, 1999: *Brucella* outer membrane lipoproteins Share antigenic

- determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immuno*, 6, 627-629.
- Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiébaud M, Dubray G, 1996: Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J Appl Bacteriol*, 81, 267-275.
- Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC, 2004: Occurrence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha Proteobacteria. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11 (5), 868-873.
- Ducrotoy MJ, Munoz PM, Conde-Alvarez R, Blasco JM, Moriyon I, 2018: A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Prev Vet Med*, 151, 57-72.
- Holmes B, Popoff M, Kiredjian M, Kersters K, 1998: *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. from human clinical specimens and previously known as Group Vd. *Int J of Syst Bacteriol*, 38,406-416.
- Velasco J, Diaz R, Grilló MJ, Barberán M, Marín C, Blasco JM and Moriyón I, 1997: Antibody and delayed-type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella* spp. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4, 279-284.
- Velasco J, Romero C, López-Goñi I, Leiva J, Díaz R, Moriyón I, 1998: Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov. a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol*, 48,759-768.
- Vila A, Pagella H, Bello GV, Vicente A, 2016: *Brucella suis* bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system. *J Infect Dev Ctries*, 10 (4), 432-436.
- Vizcaino N, Cloekaert A, Verger J, Grayon M, Fernandez-Lago L, 2000: DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microb Infect*, 2 (9),1089-1100.
- Yi EC, Hackett M, 2000: Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram negative bacteria. *Analyst*, 125 (4), 651-6.
- Xu J, Moore JE, Millar BC, Crowe M, McClurg R, Heaney LG, 2003: Identification of a novel alphaproteobacterium causing bacteremia in immunocompetent patient. *J Infect*, 47, 167-169.

*Yazışma Adresi: Sevil Erdenliğ Gürbilek
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD,
Şanlıurfa, Türkiye.
e-mail: serdenlig@harran.edu.tr

Investigation the Existence of European Foulbrood Disease in Larvae and Adult Honeybees in Some Regions of Turkey with Conventional PCR Method*

Serdal Tarhane^{1,a,**}

¹Çankırı Karatekin University, Eldivan Health Services Vocational High School, Department of Veterinary Medicine, Veterinary Medical Laboratory Technician Program, Çankırı, Turkey.

^aORCID: 0000-000-30806-7659

Geliş Tarihi: 15.02.2021

Kabul Tarihi: 12.04.2021

Abstract: European foulbrood disease caused by *Melissococcus plutonius* which gram-positive bacterium that leads to larval deaths with its worldwide prevalence, paving the way for beehives to die away over time. It causes economic losses in honey production. Bee breeding and honey production are economically pivotal in Turkey, and it is vital to analyze the prevalence of this disease. This study aims to identify *M. plutonius* from the honeycombs suspected of European foulbrood and dead bee samples from the beehives (11 hives in total) that contain honeycombs collected from Cankırı, Hatay, Kars and Konya via conventional PCR method. In this study two samples DNA identified as *M. plutonius* (18% of total hives).

Key Words: European foulbrood, Honey bees, *M. plutonius*, Turkey.

Türkiye'nin Bazı Bölgelerindeki Larva ve Yetişkin Bal Arılarında Avrupa Yavru Çürüklüğü Hastalığı Varlığının Konvansiyonel PCR Yöntemi ile Araştırılması

Özet: Avrupa yavru çürüklüğü hastalığı *Melissococcus plutonius* Gram-pozitif bakteri etkenli bir hastalık olup dünya çapında yaygınlığıyla larva ölümlerine yol açmakta, arı kovanlarının zamanla sönmesine ve bal üretiminde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle arı yetiştiriciliği ve bal üretiminin ekonomik olarak önem arz ettiği ülkemizde bu hastalığın yaygınlığının araştırılması önemini korumaktadır. Bu çalışmada Çankırı, Hatay, Kars ve Konya illerinden toplanan Avrupa yavru çürüklüğü şüpheli petek ve bu petekleri içeren kovanların (toplam 11 kovan) önünden alınan ölü arı örneklerinden konvansiyonel PCR yöntemiyle bu hastalık etkeni *M. plutonius*'un varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Alınan kovanlara ait örneklerin 2'sinde (toplam kovanların %18'inde) *M. plutonius* varlığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Avrupa yavru çürüklüğü, Bal arıları, *M. plutonius*, Türkiye.

Introduction

European foulbrood disease is a larval disease caused by *M. plutonius* gram-positive bacterium and observed in bee colonies (Belloy et al., 2007). *Melissococcus plutonius* is a lancet-shaped bacterium that can be seen via an anaerobic microscopic view. In plenty of issues are indicated that *M. plutonius* spreads to every continent where honey bees live, and this disease agent is transmitted to the larvae by adult bees during feeding (Budge et al., 2010).

European foulbrood infects the larvae in the colony, particularly in countries where honey production is common, paving the way for the colony to collapse, thereby leading to severe economic losses. In an epidemiological study conducted by Forgsen et al. (2005) in Sweden, they observed that the disease incidence increased for no reason in 2005. There is insufficient information about the diseases' epidemiology.

Honey bee diseases are categorized as viral, parasitic, bacterial, and fungal, and such diseases often lead to severe consequences. Researches reveals that one of the most vital diseases inducing

larvae is European foulbrood disease (Waite et al., 2003). The common application of antibiotics in bee colonies by producers to eliminate bacterial and parasitic diseases threatens people's health that consumes honey obtained from such bee colonies. It leads to the formation of bacterial strains resistant to antibiotics and the spread of this disease (Barganska et al., 2011).

China ranks the top with 543.000 tons of honey production, and Turkey takes second place with 115.000 tons annually per a report published by the Institute of Agricultural Economics and Policy Development in 2020 (Agricultural Economy and Policy Development Institute, 2020). Considering such figures, identifying the prevalence of bee diseases and combating such diseases is vital for both the manufacturer and the country's economy.

While *M. plutonius*'s epizootiology is not entirely understood, which infects honey bee colonies and causing European foulbrood, It is observed that the larvae infected with this bacterium die rapidly are two and three days old.

Besides, *M. plutonius*, causing European foulbrood disease, *Achromobacter Eurydice*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis*, and *Paenibacillus alvei* are identified in the colonies during the development of this disease. However, it is unclear what role they play in developing this disease (Alippi, 1991). It aims to identify *M. plutonius* via the conventional PCR method, which causes European foulbrood in honeycombs and bees obtained in some Turkey provinces.

Material and Methods

Local ethics comitte permission: The materials used in this study are not subject to the permission of HADYEK according to the article 8. of the regulation published in the Official Gazette dated February 15, 2014.

Cultural and molecular techniques are frequently employed in identifying the *Melissococcus plutonius*. In many study were indicated that each method has advantages and disadvantages. *M. plutonius* diagnosis is usually based on the combs' color and smell; however, such

symptoms can be easily confused with other abnormalities and diseases. It were noted that the cultural methods used for identifying *M. plutonius* have some difficulties as they allow secondary bacteria to grow in the environment (Arai et al., 2012).

In May and June collected dead bee samples of larvae and hives from beehives of beekeepers in Hatay, Konya, Çankırı and Kars provinces (**Kars:** 150-beehive business: 1 suspect, 200-beehives business: 1 suspect, 500-beehives business: 1 suspect; **Çankırı:** 20-beehives business: 1 suspect, 10-beehives business: 1 suspect, 20-beehives business: 1 suspect, 35-beehives business: 1 suspect; **Hatay:** 250-beehives business: 2 suspects; **Konya:** 1 suspect from each of the 50 and 45 beehives business: total 11 suspect hives). We obtained one piece from each of the combs containing *M. plutonius* suspicious dead larvae (yellow, brown, and foul odor), placed them in locked bags, and stored them at -20 ° C examination in the laboratory. We placed adult dead bees in front of the same hive in different locked bags and stored them under the same conditions.

Figure 1. Suspected larvae and honeycomb samples.



Molecular Identification: Adult bee and larvae samples were taken into disposable falcon tubes containing 1 ml of physiological saline and homogenized (adult bees were dissected) (Budge et al., 2010). Qiagen DNA for the DNA extraction kit was employed, and the extraction was conducted per the manufacturer's recommendation.

Concentration for PCR reaction: 2.5 µl MgCl₂, primers 1µl (from each primer),

Primer 1: 5' GAAGAGGAGTAAAAGGCGC 3',

primer 2: 5' TTATCTCTAAGGCGTCAAAGG 3',

0.5 µl deoxynucleoside triphosphate (dNTP), buffer 2.5 µl, DNA 2.5 µl, RNase and DNase free water 14.5 µl, Taq DNA polymerase was optimized to 0.5 µl.

PCR conditions: starting; 95°C (1min), chain elongation; 93°C (1 min), 55°C (30 sec) and 72°C (1 min), 30 cycles, the last cycle was applied at 72°C (5 min) using a Bio-Rad gradient heat machine. The positive control sample was obtained from the Kafkas University Microbiology Laboratory, and DNase-RNase-free water was used for negative control. The horizontal gel electrophoresis technique was used to visualize the PCR products. The PCR products were placed in 0.8% agarose gel wells stained with ethidium bromide and run in an electrophoresis tank containing TBE buffer solution at 110 volts and 300 milli-ampere for 40 minutes. The bands formed were compared with the hyper

ladder 1 kb, and the resulting DNA fragments were imaged on the UV transilluminator. The resulting images were photographed and documented. Bands corresponding to 812 base pairs (bp) rated as *M. plutonius* positive (Govan et al., 1998; Tibata et al., 2018).

Results

The analysis of the electrophoresis images reveals that *M. plutonius* positive bands were observed from 1 suspicious larva sample taken from the honeycombs in Hatay and one dead bee sample taken from 11 combs in Çankırı in total from Çankırı, Konya, Hatay and Kars (in 18.18% of combs, suspicious of *M. plutonius*) (Figure 2. and Table 1).



Figure 2. Electrophoresis image (4. Negative control, 5. Positive control, 6. and 7. (812 bp.) *M. plutonius* positive)

Table 1. sampling and PCR findings

Regions where samples were collected	Number of hives in enterprises	Number of suspected samples	Findings of PCR
Çankırı	20	1	1
	10	1	
	20	1	
	35	1	
Hatay	250	2	1
	150	1	
Kars	200	1	0
	500	1	
Konya	50	1	0
	45	1	
Total	1,255	11 (0.876 %)	2 (18%)

Discussion and Conclusion

It is known that honey bee breeding, which is one of the most widespread insect breeders globally, is vital in ecological aspects besides its economic dimension, considering the economic value of bee products and the role of bees in the pollination of plants. *M. plutonius*, a European foulbrood disease agent, infects the larvae during colonized feeding in the intestinal of adult bees and paving the way for dying out of young colonies. Today, antibiotics are used in treating this disease.

However, the use of such antibiotics is prohibited by some countries as it is not a definitive solution in treating this disease, leaves residue in the honey, and causes more resistant strains (Grossar et al., 2020).

It is observed that *M. plutonius* causes European foulbrood, infects honeybee larvae, and dies in combs. It paves the way for morphologically normal-looking larvae to bent at the bottom of the combs, their color shift from pearl white to yellow, then brown and grey-black (Roetschi et al., 2008).

Identifying the presence of *M. plutonius* in brown and malodorous honeycombs in this study supports the literature studies.

Determining the presence of *M. plutonius* in the laboratory is extremely important for confirming European foulbrood disease in honey, larvae and adult bees. The diagnosis of European pup rot disease can be determined by breeders from the change in color and smell that occurs in dead larvae but it is noted that these symptoms are quite insufficient to make a definitive diagnosis. In a study conducted by Rana et al. in India, investigated with PCR method, they noted that only 15% were positive of bee colonies infected with *M. plutonius* had a characteristic yellow color and vinegar odor (Rana et al., 2012).

Finding 18% of the suspicious hives with *M. plutonius* as positive is similar to the results found by Rana et al. 2012.

In a study conducted with the method of PCR and DNA sequence analysis with isolates obtained from 7 beekeeping regions in Mexico, it was reported that the highest prevalence was 59% and the lowest prevalence was 14%, typical and atypical strains were detected (de Leon-Door et al. 2018).

A wide range of pathogens can cause foulbrood disease. However, European foulbrood is caused by *M. plutonius*. From the isolates taken by cultural methods from the samples obtained from 725 hives in the Northern Marmara region by Borum et al., 37 bacteria were detected by PCR method; however, no *M. plutonius* was found (Borum et al., 2015). The difficulty of culturing in vitro of *M. plutonius* and effective seasonal and regional conditions in its prevalence can change the results (Budge et al., 2010).

While *Mellissococcus plutonius* suspiciously or undoubtedly is available in combs and larvae, noted that they can be found in asymptomatic larvae and adult bees. However, it is observed that they remain enzootic in healthy colonies (Lewkowski and Eler, 2018). European foulbrood disease has been reported to be more severe in bee colonies in the presence of nutrient deficiency and stress (Jyothis and Amritha, 2019). While this study does not consider stress and nutrient deficiency, it is

suggested that researchers should consider these factors in future studies.

European foulbrood disease is caused by *M. plutonius*, and it is a bee larval disease that is widespread worldwide, but its prevalence may vary from country to country and causes serious larval death and extinction of beehives at certain times (Forgsen et al., 2005). It is observed that *M. plutonius* is carried by adult worker bees during feeding and infects the larvae (McKee et al., 2004). Identifying *M. plutonius* in adult bees in this study supports the literature studies.

In conclusion, there is insufficient research on European foulbrood disease in Turkey, and it is believed that more sophisticated epidemiological research and identifying the antibiotic resistance profiles of *M. plutonius* will benefit for eradicating it.

Acknowledgments

Great thanks to Kafkas University of Veterinary Faculty Microbiology Department for all of their supports and contributions.

References

- Alippi, 1991: Comparison of Laboratory Techniques for the Detection of Significant Bacteria of the Honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J Apicult Res*, 30(2): 75-80.
- Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura, N, Takamatsu D, 2010: Diversity of *Melissococcus plutonius* from Honeybee Larvae in Japan and Experimental Reproduction of European Foulbrood with Cultured Atypical Isolates. *PLoS ONE*, 7(3): 1-9.
- Barganska Z, Slebioda M, Namiesnik J, 2011: Determination of antibiotic residues in honey. *Trends Analyt Chem*, 30(7): 1035-1041.
- Belloy L, Imdorf A, Fries I, Forsgren E, Berthoud H, Kuhn R, Charriere JD, 2007: Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie*, 2(38): 136-140.
- Borum AE, Özakin C, Güneş E, Aydın L, Ülgen M, Çakmak İ, 2015: The Investigation by PCR and Culture Methods of Foulbrood Diseases in Honey Bees in South Marmara Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(1): 95-99.
- Budge GE, Barrett B, Jones B, Pietravalle S, Marris G, Chantawannakul P, Thwaites R, Hall J, Cuthbertson AGS, Brown MA, 2010: The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J Invertebr Pathol*, 105(2): 164-70.
- Door APL, Chacon AR, Velasco CR, Flores PBZ, Paz JJO, Muniz CHA, 2018: Prevalence, typing and phylogenetic analysis of *Melissococcus plutonius* strains from bee colonies of the State of Chihuahua, Mexico. *J Invertebr Pathol*, 159(2018): 71-77.
- Forsgren E, Cassel L, Imdorf A, Fries I. 2005. Distribution of *Melissococcus Plutonius* in Honeybee Colonies With and Without Symptoms of European Foulbrood. *Microb Ecol*, 50(3): 369-74.
- Govan VA, Brozel V, Allsopp MH, Davidson SA, 1998: PCR Detection Method for Rapid Identification of *Melissococcus pluton* in Honeybee Larvae. *APPL. Environ Microbiol*, 64(5): 1983-1985.
- Grossar D, Kilchenmann V, Forsgren E, Charrière JD, Gauthierb L, Ma MC, Dietemann V, 2020: Putative determinants of virulence in *Melissococcus plutonius*, the bacterial. *Virulence*, 11(1): 554-567.
- Jyothis PJ and Amritha VS, 2019: Survey and etiology of bacterial brood disease infecting Indian honey bees (*Apis cerana indica* F.) in Southern Kerala. *J Apic Sci*, 59(4): 519-527.
- Lewkowski O, and Erler S, 2018: Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee. *Microbiology Open*, 8(3): 1-9.
- McKee BA, Goodman RD, Hortnitzk MA, 2004: The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *J Apic Sci*, 43(3): 93-100.
- Rana BS, Rao KM, Chakravarty KS, Katna S, 2012: Characterization of *Melissococcus plutonius* causing European foulbrood disease in *Apis cerana* F. *J Apic Sci*, 51(4): 306-311.
- Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A, 2008: Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39 362–371.
- Tarım İktisadi ve Sosyal Araştırmalar Enstitüsü, 2020: Tarım Ürünleri Piyasaları, Arıcılık. Ocak 2020, No. Hü-01. Erişim: arastirma.tarimorman.gov.tr.
- Tibata VM, Junca H, Sanchez A, Corona M, Botero FA, Figuero J, 2018: Molecular detection of *Melissococcus plutonius* assessed in Africanized honey bee populations (*Apis mellifera*) in three regions of Colombia, *J Apic Sci*, 57 (3), 418-424.
- Waite R, Jackson S, Thompson H, 2003: Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus plutonius*, a pathogen of honeybee larvae. *Lett Appl Microbiol*, 36 (1), 20-24.

*Correspondence: Serdal TARHANE

Çankırı Karatekin University, Eldivan Health Services Vocational High School, Department of Veterinary Medicine, Veterinary Medical Laboratory Technician Program, Çankırı, Turkey.

**The summary of this study was presented as orally at the 14th National Veterinary Microbiology Congress dated 13-16 October 2020.

e-mail: serdaltarhane@karatekin.edu.tr

Tiftik Keçilerinde Doğum Şeklinin Bazı Oksidatif Stres Belirteçleri ve Hormon Konsantrasyonları Üzerine Etkisi

Serdal KURT^{1,a,*}, Nebi ÇETİN^{2,b}, Funda EŞKİ^{3,c}

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Bölümü, 65080, Van, Türkiye

³Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 01330 Adana, Türkiye

^aORCID: 0000-0002-0191-3245, ^bORCID: 0000-0001-6073-4215, ^cORCID: 0000-0001-8575-7042

Geliş Tarihi: 016.02.2021

Kabul Tarihi: 20.04.2021

Özet: Güç doğum, spontan doğumun belirli bir zaman içerisinde herhangi bir müdahale olmadan gerçekleşmediği olgu olarak tanımlanmaktadır. Güç doğum steroid hormon seviyesi ile ilişkili olabilmekte ve oksidatif stres üzerine etki edebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, normal ve sezaryen ile doğum yapan Tiftik keçilerinde malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), total glutatyonun (GSH) progesteron (P4) ve östradiol (E2) konsantrasyonlarını değerlendirmektir. Yapılan çalışmada, keçiler normal (n=10) ve sezaryen ile doğum (n=10) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Her iki grubun kan örnekleri, doğumdan sonraki ilk yarım saat içinde jugular venadan alındı. MDA, GSH-Px, total GSH seviyelerinde gruplar arasında önemli bir farklılık (P>0.05) görülmedi. Sezaryen grubunda hem SOD (P<0.01), hem de P4 ve E2 konsantrasyonları anlamlı olarak daha yüksekti (P<0.05). Sonuç olarak, sezaryen ile doğum yapan keçilerde SOD, P4 ve E2 seviyelerinde farklılıklar gözlemlendi. P4 ve E2 konsantrasyonlarındaki farklılıkların güç doğumun etiopatogenezinde rol alabileceği ve güç doğuma bağlı artan strese karşı mücadele için endojen bir antioksidan madde olan SOD'un üretiminin arttığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Doğum şekli, Hormon, Keçi, Oksidatif stres.

The Effect of Delivery Mode on Some Oxidative Stress Markers and Hormone Concentrations in Angora Goats

Abstract: Dystocia is defined as the situation in which spontaneous parturition cannot occur at a given time without any intervention. It can be related to steroid hormone levels and can affect oxidative stress. The purpose of this study was to evaluate the concentrations of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), total glutathione (GSH), progesterone (P4), and estradiol (E2) in goats which were parturated normally and with cesarean section. In the study, goats were divided into two groups as normal delivery (n=10) and cesarean delivery groups (n=10). Blood samples of both groups were taken from the jugular vein within the first half-hour after parturition. There was no statistically (P>0.05) difference between the groups in MDA, GSH-Px, total GSH levels. Differences in both SOD (P<0.01) and levels of P4 and E2 were significantly higher in the cesarean group (P<0.05). In conclusion, differences were observed in SOD, P4, and E2 concentrations in goats delivered by cesarean section. It was concluded that the differences in P4 and E2 concentrations might play a role in the etiopathogenesis of dystocia, and the production of SOD, an endogenous antioxidant substance, has increased to combat the increased stress due to dystocia.

Keywords: Delivery mode, Goat, Hormone, Oxidative stress.

Giriş

Doğum, fizyolojik olarak annede hematolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açan maternal, fetal ve plasental dokularda karmaşık ve ardışık bir dizi endokrin olay olarak gerçekleşmektedir (Hussein ve Abdellah, 2008). Güç doğum (dystocia), spontan doğumun belirli bir zaman diliminde şekillenemediği veya herhangi bir müdahale olmadan gerçekleşemediği, anne ve/veya yavrunun hayatlarının tehlikeye girdiği olgu olarak tanımlanmaktadır (Arthur, 1975). Keçilerde güç doğum ile karşılaşma oranı ortalama %7'dir (Abdul Rahman ve ark., 2000) ve keçilerde güç doğum üreme problemlerinin önemli bir kısmını

oluşturmaktadır (Majeed ve Taha, 1989). Güç doğumun ekonomik etkisi fetal ve maternal kayıplar, sonraki dönemde fertilitite sorunu ve tedavi maliyetleri olarak ortaya çıkmaktadır (Bicalho ve ark., 2007). Doğum fizyolojik bir olay olmasına rağmen oldukça stresli bir durumdur (Singh ve ark., 2011) ve güç doğumun stresi daha da artırdığı bilinmektedir (Nakao ve Grunert, 1990). Aşırı stresli koşullar altında, adrenalin, noradrenalin ve glukokortikoid seviyeleri yükselerek aşırı düzeyde reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine neden olarak oksidatif stres oluşumuna katkı sağlar (Freeman ve Crapo, 1982). Ancak, normal şartlarda

dahi peripartum dönem yoğun metabolik değişiklikler nedeniyle oksidan maddelerin aşırı miktarda üretilmesi ile karakterizedir. Böylece bu evrede oksidatif strese karşı duyarlılığın arttığı bilinmektedir (Bondurant, 1999). Ayrıca güç doğumun steroid hormon konsantrasyonu üzerine de etki edebildiği bilinmektedir (Civelek ve ark., 2008; Heuwieser ve ark., 1987). Oksidatif stres antioksidan savunma sistemi ile yakından ilişkili olup antioksidan ve oksidan düzeyleri arasındaki dengenin oksidan lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır (Sies, 1991). Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) yaygın enzimatik antioksidanlar arasında yer almaktadır (Aggarwal ve Prabhakaran, 2005) ve düzeyleri antioksidan aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir (Kleczkowski ve ark., 2003). Ayrıca lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehid (MDA) oksidatif stresin bir indikatörü olarak bilinmektedir (Lata ve ark., 2004). Dolayısıyla SOD, GSH-Px, GSH ve MDA oksidatif stres belirteçleri olarak kullanılabilir (Thangamani ve ark., 2019; Wani ve Mavi, 2020).

Sunulan çalışma; doğum şeklinin oksidatif stres belirteçleri ve steroid hormon seviyelerini etkileyebileceği düşünülerek normal ve sezaryen ile doğum yapan Tiftik ırkı keçilerde MDA, SOD, GSH-Px, total glutatyon (GSH), progesteron (P4) ve östradiol (E2) seviyelerindeki değişimleri araştırmak amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot

Etik onay: Sunulan çalışma için Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi Yerel Etik Kurulundan 25.08.2020 tarih ve 06/03 no'lu karar ile etik kurul izni alındı.

Hayvanlar ve gruplandırma: Sunulan çalışma 2-3 yaşında, benzer şartlarda barındırılan, yarı entansif sistemde yonca korunga karışımı ve kaba yem ile beslenen, gebeliğinin son döneminde klinik olarak sağlıklı olan toplam 20 adet Tiftik ırkı keçi üzerinde yürütüldü. Keçiler normal doğum yapan (normal doğum; n=10) ve güç doğuma bağlı sezaryen ile doğum yapan (sezaryen; n=10) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Normal doğum grubundaki keçilerin doğumu hiçbir müdahale olmadan kendiliğinden gerçekleşti. Sezaryen grubunda doğum belirtileri başlayan keçilere yapılan klinik muayeneler sonucunda servikal genişlemede saptanan yetersizliğe bağlı olarak güç doğum tanısı kondu. Bu nedenle sezaryen operasyonuna karar verildi. Keçilere operasyon öncesi premedikasyon amacıyla 0,05 mg/kg dozunda intramusküler yolla ksilazin hidroklorür (Xylazinbio %2, İnterhas, 20 mg/ml) uygulandı. Yaklaşık 10 dakika sonra, sedasyonun sağlanması ile birlikte sol fossa

paralumbal bölgesi asepsi ve antisepsi kuralları dikkate alınarak operasyon için hazırlandı. Daha sonra 5 mg/kg dozunda lidokain hidroklorür kullanılarak operasyon bölgesine lokal infiltrasyon anestezisi yapıldı (ters L-blok, %2, 20 mg/mL) ve operasyon yürütüldü.

Kan örneklerinin alınması ve biyokimyasal analizler: Normal doğum ve sezaryen gruplarında bulunan keçilerin kan örnekleri yavrular doğduktan sonra ilk yarım saat içinde uygun iğneler kullanılarak jugular venadan pıhtılaşma aktivatörü içeren steril vacutainer tüplerine (Hema & Tube®, İtalya) alındı. Toplanan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum örnekleri antioksidan (MDA, SOD, GSH-Px, total GSH) ve hormon (P4 ve E2) düzeyleri belirleninceye kadar -20 °C'de saklandı.

Serum MDA, GSH, SOD, GSH-Px ve total GSH seviyeleri ticari ELISA kitleri (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Erel (2005) tarafından tanımlanmış spektrofotometrik yöntemle göre ELISA cihazı (TECAN, Sunrise® İsviçre) kullanılarak ölçüldü.

Serum P4 (Progesterone II, cobas®, Roche) ve E2 (Estradiol II, cobas®, Roche) seviyeleri ticari kitler kullanılarak otomatik Elecsys Immuno Analyser (ECLIA; Roche Diagnostics, Mannheim®, Almanya) ile ölçüldü (Çetin ve ark., 2021).

İstatistiksel analiz: Elde edilen bulguların istatistiksel analizleri SPSS paket programı (16.0, USA) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro – Wilk testi ile analiz edildi.

Gruplardaki ölçümler normal dağılım gösterdiğinden dolayı parametrik testler kullanıldı. Gruplar arası MDA, GSH, SOD, GSH-Px, total GSH, P4 ve E2 konsantrasyonları bağımsız T-testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata ($\bar{X} \pm S\bar{X}$) olarak sunuldu. P < 0.05 istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

Oksidatif stres belirteçleri: Normal doğum ve sezaryen gruplarının MDA konsantrasyonları sırasıyla 1.59 ± 0.02 $\mu\text{mol/L}$ ve 1.6 ± 0.01 $\mu\text{mol/L}$ (P>0.05) olarak ölçüldü. GSH-Px seviyesinin normal doğum grubunda 184.28 ± 22.75 nmol/min/ml ve sezaryen grubunda 174.15 ± 32.20 nmol/min/ml (P>0.05) olduğu tespit edildi. Normal doğum ve sezaryen gruplarının total GSH düzeyleri ise sırasıyla 3.46 ± 0.44 μm ve 3.18 ± 0.65 μm (P>0.05) olarak bulundu. SOD düzeyi normal doğum grubuna göre (2.36 ± 0.28) U/mL sezaryen grubunda (3.21 ± 0.10) U/mL önemli düzeyde daha yüksek olarak (P < 0.01) bulundu (Tablo 1).

Tablo 1: Normal doğum ve sezaryen grubunda doğum sonrası bazı oksidatif stres belirteçlerinin konsantrasyonları ($\bar{X} \pm S\bar{X}$).

Grup	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/ml)	GSH-Px (nmol/min/ml)	Total GSH (μm)
Normal doğum (n=10)	1.59 \pm 0.02	2.36 \pm 0.28	184.28 \pm 22.75	3.46 \pm 0.44
Sezaryen (n=10)	1.6 \pm 0.01	3.21 \pm 0.10*	174.15 \pm 32.20	3.18 \pm 0.65

*P < 0.05

Hormonlar: P4 konsantrasyonu normal doğum grubuna (0.30 \pm 0.25) ng/mL kıyasla sezaryen grubunda (2.28 \pm 0.47) ng/mL önemli düzeyde (P < 0.01) daha yüksek ölçüldü. Sezaryen grubunun E2

seviyesinin (197.60 \pm 53.64) pg/mL normal doğum grubuna (39.60 \pm 4.92) pg/mL göre önemli seviyede daha yüksek (P < 0.01) olduğu görüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Normal doğum ve sezaryen grubunda doğum sonrası P4 ve E2 konsantrasyonları ($\bar{X} \pm S\bar{X}$).

Grup	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)
Normal doğum (n=10)	0.30 \pm 0.25	39.60 \pm 4.92
Sezaryen (n=10)	2.28 \pm 0.47**	197.60 \pm 53.64**

**P < 0.01

Tartışma ve Sonuç

E2 ve P4 gibi steroid hormonların vücutta doğal olarak üretilen güçlü antioksidanlar olarak görev yaptığı dolayısıyla bunların konsantrasyonlarının oksidatif stres üzerine etki edebileceği bildirilmiştir (Barp ve ark., 2002). Ayrıca, güç doğum stresinin antioksidan aktivitesi üzerine etki edebildiği rapor edilmiştir (Bansal ve ark., 2011). Sathya ve ark. (2007) doğum esnasında kas eforuna bağlı olarak oksidatif stresin gelişebildiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak, başka bir araştırmada güç doğumdan etkilenen mandalarda MDA düzeyinin normal doğum yapanlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Bansal ve ark., 2011). Erisir ve ark. (2006) ise kontrol grubuna göre sezaryen geçiren ineklerde MDA düzeyinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, bu çalışmada MDA seviyesi bakımından gruplar arası anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Bu durumun antioksidan savunma sistemindeki farklılıklardan

kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Markiewicz ve ark. (2005) doğumdan önce ve doğum sırasında oksidan düzeyindeki artışa bağlı olarak SOD aktivitesinde potansiyel bir yükselme olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir araştırmada ise normal doğum yapan mandalara göre güç doğumdan etkilenmiş olanlarda SOD aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Bansal ve ark., 2011). Bununla birlikte sağlıklı ineklere göre plasental retensiyonlu ineklerde prepatum döneminde serum SOD konsantrasyonunun arttığı ancak doğum sonrasında ise bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir (Yazlık ve ark., 2019). Wani ve Mavi (2020)'nin yürüttüğü bir çalışmada güç doğum sonucu fütotomi uygulanan mandalarda SOD seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada, normal doğum grubuna kıyasla sezaryen grubunda SOD seviyesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Stres, oksihemoglobinin methemoglobine oksidasyonuna yol açarak süperoksit iyonlarının (O_2^-) üretimini stimüle eder ve bu da SOD aktivitesini

artırmaktadır. Bu durum güç doğumdan etkilenen mandalarda SOD seviyesinin yükselmesi ile ilişkilendirilmiştir (Wani ve Mavi, 2020). Bununla birlikte, E2'nin SOD transkripsiyon oranını yükselttiği bilinmekte olup östrojenin SOD aktivitesini uyardığı ve insanlarda yüksek östrojen seviyesinin dolaşımdaki SOD ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Strehlow ve ark., 2003). Benzer şekilde, Eşki ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada E2 seviyesi yüksek olan keçilerde toplam antioksidan seviyesinde yüksek olduğu rapor edilmiştir. Sunulan çalışmada sezaryen grubunda hem E2 hem de SOD seviyesindeki artışın bu bilgilerle desteklendiği düşünülmektedir. Ayrıca diğer bir çalışmada güç doğumun serum GSH-Px düzeyine de etki edebileceği ifade edilmiştir (Thangamani ve ark., 2019). Erisir ve ark. (2006) tarafından yürütülen bir çalışmada kontrol grubuna göre sezaryen operasyonu geçiren ineklerde GSH-Px konsantrasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada GSH-Px ve total GSH düzeyleri bakımından bir fark elde edilmedi. Sunulan çalışmada gruplar arası serum MDA, GSH-Px ve total GSH seviyeleri bakımından farklılıkların olmayışının kan alım zamanı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca doğumdan sonraki günlerde belirtilen parametrelerde de farklılıkların oluşabileceği öngörülmektedir.

Doğumun endokrin bir düzen içerisinde gerçekleştiği bilinmektedir (Thorburn ve Challis, 1979). Keçilerde gebeliği devam ettiren hormon olan P4, tüm gebelik boyunca korpus luteum tarafından salgılanır (Thorburn ve Schneider, 1972; Van Rensburg, 1971), gebeliğin sonlarına doğru artan fetal kortizol PGF2 alfa salınımını artırarak P4 düzeyinde azalmaya ve doğumun başlamasına neden olur (Skidmore, 2011; Thorburn ve Challis, 1979). Ayrıca, E2 seviyesi doğumun başlamasında önemli bir rol oynamaktadır ve doğumdan önce arttığı bildirilmiştir (Khanum ve ark., 2008). Güç doğum olgusunun bazı steroid hormon mekanizması üzerine etki edebildiği ve seviyelerinde farklılıklar oluşturabildiği ifade edilmiştir (Hydbring ve ark., 1999). Benzer olarak, Probo ve ark. (2011) güç doğumun peripartal hormon düzeyi ile ilişkili olabileceğini ve Alp keçilerinde güç doğumun E2 ve P4 konsantrasyonlarını etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Ghoneim ve ark. (2016) güç doğumunun develerde serum P4 düzeyini artırdığını ancak E2 konsantrasyonu üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Öte yandan Olujuhunge ve ark. (1998) güç doğum geçiren düvelerde doğum öncesi dönemde P4 seviyelerinin düşük, tüm östrojen düzeylerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Bennetts ve ark. (1946) yüksek östrojen seviyesinin güç doğuma

neden olabileceğini rapor etmişlerdir. Sunulan çalışmada ise sezaryen grubunun P4 (2.28±0.47) ng/mL ve E2 (197.60±53.64) pg/mL seviyeleri normal doğum grubuna göre daha yüksek bulundu. İneklerde P4'ün düşüşündeki gecikmenin güç doğuma neden olabileceği bilinmektedir (Zhang ve ark., 1999). Böylece sezaryen grubunda P4 seviyelerinin yüksek olmasının güç doğumla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Khanum ve ark. (2008) normal olarak şekillenen doğumdan hemen önce östradiol seviyesinin arttığını ve doğumdan hemen sonra düşmeye başladığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, doğumdan önce ve doğum sırasındaki yüksek östron sülfat düzeyinin ineklerde güç doğum riskini artırdığı belirtilmiştir (Saint-Dizier ve Chastant-Maillard, 2015). Benzer olarak, başka bir çalışmada develerde yüksek E2 konsantrasyonu ile güç doğum arasında pozitif bir ilişki olabileceği ifade edilmiştir (Ali ve ark., 2016). Ayrıca, östrojenlerin plasentada üretildiği ve plasentanın fonksiyonel işleyişinin E2 üzerine etki edebileceği bilinmektedir (Shah ve ark., 2005). Bu çalışmada normal doğum grubuna göre sezaryen grubunda E2 konsantrasyonunun yüksek bulunmasının güç doğumla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, güç doğumdan etkilenen keçilerde serum P4, E2 ve SOD aktivitelerinin yükseldiği gözlemlendi. P4 ve E2 konsantrasyonlarındaki farklılıkların güç doğumun etiopatogenezinde rol alabileceği ve güç doğumun oluşturduğu strese karşı mücadele için endojen bir antioksidan madde olan SOD'un üretimini arttığı kanaatine varıldı. Ayrıca gruplar arası serum MDA, GSH-Px ve total GSH seviyelerinin benzer bulunması kan alımının doğumdan hemen sonra olması ile ilişkili olabileceği, ilerleyen zaman diliminde belirtilen biyokimyasal parametrelerde de değişimlerin oluşabileceği öngörülmektedir.

Çıkar çatışması

Yazarlar aralarında çıkar çatışması olmadığını bildirir.

Bilgilendirme

Sunulan çalışma 4. Uluslararası Akdeniz Sempozyumu'nda (22-24 Ekim 2020, Mersin) özet metin olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

Ali A, Derar D, Tharwat M, Zeitoun MM, Alsobyil FA, 2016: Dystocia in dromedary camels: prevalence, forms, risks and hematobiochemical changes. *Anim Reprod Sci*, 170, 149-156.

- Abdul Rahman LY, Al-Janabi AS, Asofi MK, 2000: Study of some reproduction aspects of the mature local Iraqi goats. *The Veterinarian*, 10 (1), 47-60.
- Aggarwal A, Prabhakaran SA, 2005: Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*, 43 (11), 963-974.
- Arthur GH, 1975: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 4th ed., Bailliere Tindall., London, UK.
- Bansal AK, Singh AK, Cheema RS, Brar PS, Gandotra VK, Singh P, Prabhakar S, 2011: Status of oxidative stress and antioxidant enzymes in normally calved and dystocia affected buffaloes. *Indian J Anim Sci*, 81 (9), 915.
- Barp J, Araújo ASDR, Fernandes TRG, Rigatto KV, Llesuy S, Belló-Klein A, Singal P, 2002: Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Bjmb*, 35 (9), 1075-1081.
- Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL, 1946: A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J*, 22, 2-12.
- Bicalho RC, Galvão KN, Cheong SH, Gilbert RO, Warnick LD, Guard CL, 2007: Effect of stillbirths on dam survival and reproduction performance in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 90 (6), 2797-2803.
- Bondurant RH, 1999: Inflammation in the bovine female reproductive tract. *Anim Sci J*, 77 (2), 101-110.
- Cetin N, Funda E, Leyla M, Naseer Z, Bolacalı M, 2021: Dynamics of Oxidants, Antioxidants and Hormones During Different Phases of Pregnancy in Hairly Goats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 27 (1): 117-121.
- Civelek T, Celik HA, Avci G, Cingi CC, 2008: Effects of dystocia on plasma cortisol and cholesterol levels in Holstein heifers and their newborn calves. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52 (4), 649-654.
- Erel O, 2005: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38 (12), 1103-1111.
- Erisir M, Akar Y, Gurgoze SY, Yuksel M, 2006: Changes in plasma malondialdehyde concentration and some erythrocyte antioxidant enzymes in cows with prolapsus uteri, caesarean section, and retained placenta. *Revue Med Vet*, 157 (2), 80-83.
- Eşki F, Kurt S, Demir PA, 2021: Effect of different estrus synchronization protocols on estrus and pregnancy rates, oxidative stress and some biochemical parameters in Hair goats. *Small Rumin Res*, 198 (2021), 1-6.
- Freeman BA, Crapo JD, 1982: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47(5), 412-426.
- Ghoneim IM, Waheed MM, Al-Eknaah MM, 2016: Effect of dystocia on some hormonal and biochemical parameters in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 86 (3), 894-898.
- Heuwieser W, Hartig U, Offeney F, Grunert E, 1987: Significance of glucocorticoids as a parameter of stress in cattle in the periparturient period. *J Vet Med*, 34 (3), 178-187.
- Hussein H, AbdEllah MR, 2008: Effects of dystocia, fetotomy and caesarian sections on the liver enzymes activities and concentrations of some serum biochemical parameters in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 105 (2008), 384-391.
- Hydbring E, Madej A, MacDonald E, Drugge-Boholm G, Berglund B, Olsson K, 1999: Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. *J Endocrinol*, 160 (1), 75-86.
- Kleczkowski M, Kluciński W, Sikora J, Zdanowicz M, Dziekan P, 2003: Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--nonenzymatic mechanisms (Part 2). *Pol J Vet Sci*, 6 (4), 301-308.
- Shah KD, Nakao T, Kubota H, 2006: Plasma estrone sulphate (E1S) and estradiol-17 β (E2 β) profiles during pregnancy and their relationship with the relaxation of sacrosciatic ligament, and prediction of calving time in Holstein-Friesian cattle. *Ani Reprod Sci*, 95 (1-2), 38-53.
- Khanum SA, Hussain M, Kausar R, 2008: Progesterone and estradiol profiles during estrous cycle and gestation in Dwarf goats (*Capra hircus*). *Pak Vet J*, 28 (1), 1.
- Lata H, Ahuja GK, Narang APS, Walia L, 2004: Effect of immobilisation stress on lipid peroxidation and lipid profile in rabbits. *Indian J Clin Biochem*, 19 (2), 1-4.
- Markiewicz H, Gehrke M, Malinowski E, Kaczmarowski M, 2005: Evaluating the antioxidant potential in the blood of transition cows. *Med Weter*, 61 (12), 1382-1382.
- Majeed AF, Taha MB, 1989: Dystocia in local goats in Iraq. *Small Rumi Res*, 2(4), 375-381.
- Nakao T, Grunert E, 1990: Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. *J Dairy Sci*, 73 (10), 2801-2806.
- Olujohungbe AA, Bryant MJ, Cobby JM, Pope GS, 1998: Relationships of peri-partum, plasma concentrations of progesterone, oestrogens and 13, 14-dihydro-15-ketoprostaglandin F2 α in heifers and of anatomical measurements of dam and calf with difficulty of calving in early-bred Hereford \times Friesian heifers. *Anim Reprod Sci*, 52 (1), 1-16.
- Probo M, Cairoli F, Kindahl H, Faustini M, Galeati G, Veronesi MC, 2011: Peripartal hormonal changes in Alpine goats: a comparison between physiological and pathological parturition. *Reprod Domest Anim*, 46 (6), 1004-1010.
- Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S, 2015: Methods and on-farm devices to predict calving time in cattle. *Vet J*, 205 (3), 349-356.
- Sathya A, Prabhakar S, Sangha SPS, Ghuman SPS, 2007: Vitamin E and selenium supplementation reduces plasma cortisol and oxidative stress in dystocia-affected buffaloes. *Vet Res Commun*, 31 (2007), 809-818.
- Sies H, (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91 (3), 31-38.
- Singh AK, Bansal AK, Prabhakar S, Cheema RS, Singh P, Brar PS, Gandotra VK, 2011: Level of cortisol in placental tissue vis-à-vis oxidative stress in dystocia affected buffaloes. *Indian J Anim Sci*, 81 (3), 235-237.
- Skidmore JA, 2011: Reproductive physiology in female old world camelids. *Anim Reprod Sci*, 124 (3-4), 148-154.
- Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Nickenig G, 2003: Modulation of antioxidant

- enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*, 93 (2), 170-177.
- Thangamani A, Prasad BC, Srinivas M, Rao KS, 2019: Evaluation of oxidative stress in maternal dystocia affected cows (*Bos indicus*): A preliminary study. *J Pharm Innov*, 8 (5), 399-402.
- Thorburn GD, Schneider W, 1972: The progesterone concentration in the plasma of the goat during the oestrous cycle and pregnancy. *J Endocrinol*, 52 (1), 23-36.
- Thorburn GD, Challis JR, 1979: Endocrine control of parturition. *Physiol Rev*, 59 (4), 863-918.
- Yazlık MO, Çolakoğlu HE, Pekcan M, Kaya U, Kaçar C, Vural MR, Kurt S, Baş A, Küplülü, Ş, 2019: The evaluation of superoxide dismutase activity, neutrophil function, and metabolic profile in cows with retained placenta. *Theriogenology*, 128, 40-46.
- Wani AA, Mavi PS, 2020: oxidative stress and hemato-biochemical status of fetotomy operated buffaloes on the day of parturition. *J Bio Innov*, 9 (5), 1036-1043
- Van Rensburg SJ, 1971: Reproductive physiology and endocrinology of normal and habitually aborting Angora goats. *Vet Res*, 38 (1) 1-62
- Zhang WC, Nakao T, Moriyoshi M, Nakada K, Ribadu AY, Ohtaki T, Tanaka Y, 1999: Relationship of maternal plasma progesterone and estrone sulfate to dystocia in Holstein-Friesian heifers and cows. *J Vet Sci*, 61 (8), 909-913.
- *Yazışma Adresi:** Serdal Kurt
Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye.
e-mail: serdal.kurt@hotmail.com

Effect of Coenzyme Q10 on Plasma Parameters in Hypothyroid Rats

Ali Osman İNAN^{1,a,*}, Zafer DURGUN^{2,b}, Oğuzcan KOCA^{3,c}, Durmuş HATİPOĞLU^{2,d}

¹Republic Of Turkey, Ministry Of National Education, Akşehir, Konya, Turkey

²Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Konya, Turkey

³Republic Of Turkey, Ministry Of Agriculture And Forestry, Artvin, Turkey

^aORCID: 0000-0001-7464-4405 , ^bORCID: 0000-0002-9385-638X , ^cORCID: 0000-0001-5311-3111,

^dORCID: 0000-0003-3790-7821

Geliş Tarihi: 22.02.2021

Kabul Tarihi: 31.05.2021

Abstract: This research was conducted to determine the effect of Coenzyme Q10 (CoQ10) on blood glucose, total protein, triglyceride, and total cholesterol levels in rats for that experimental hypothyroidism was induced. A total of 32 healthy adult male Wistar Albino rats were used as a material in the research. After the adaptation period of animals for ten days, the main research period was conducted for a total of three weeks. The rats housed as four rats in each cage during the research were divided into four experimental groups as control (K), CoQ10 (C), Hypothyroid (H), and CoQ10+Hypothyroid (CH). CoQ10 was administered intraperitoneally every day to the group C animals. In addition, propylthiouracil (PTU) was added daily to the water of rats in group H to induce experimental hypothyroidism. Both CoQ10 and PTU administration was performed on the animals in the group HC. At the end of the trial period, blood was drawn from the hearts of rats in all groups. Glucose, total protein, triglyceride, and total cholesterol levels were determined in plasma samples obtained from blood samples. It was observed in the research that hypothyroidism administration (group H) decreased plasma glucose and triglyceride values ($p<0.05$) and increased total protein and total cholesterol levels ($p<0.05$) compared to group K. In the study, it was observed that while CoQ10 administration (group HC) did not have a statistically significant effect on plasma glucose, total protein and triglyceride values in hypothyroidism-induced rats (group H), it increased the total cholesterol level ($p<0.05$). In the research, it was observed that the CoQ10 administration (group C) decreased plasma triglyceride values compared to that of group K ($p<0.05$). As a result, since CoQ10 administration increases total cholesterol level in hypothyroidism, the effect of CoQ10 supplementation on blood lipid profile in metabolic diseases should be considered.

Keywords: CoQ10, hypothyroidism, plasma parameters, rat, thyroid hormones.

Hipotiroidili Ratlarda Koenzim Q10'un Plazma Parametreleri Üzerine Etkisi

Özet: Deneysel olarak hipotiroidizm oluşturulmuş ratlarda Koenzim Q10 (KoQ10)'un kan glikoz, total protein, trigliserit ve total kolesterol düzeyleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Araştırmada materyal olarak sağlıklı toplam 32 adet yetişkin erkek Wistar Albino ırkı rattan yararlanıldı. Hayvanların10 günlük adaptasyon süresini takiben esas araştırma dönemi toplam 3 hafta sürdürüldü. Çalışma süresince her kafeste 4 rat olacak şekilde barındırılan ratlar kontrol (K), KoQ10 (C), Hipotiroid (H) ve KoQ10+ Hipotiroid (CH) olmak üzere 4 deneme grubuna ayrıldı. C grubu hayvanlara her gün intraperitoneal olarak KoQ10 uygulandı. Deneysel hipotiroidizm oluşturmak amacıyla, H grubundaki ratların sularına günlük propiltiourasil (PTU) ilave edildi. HC grubundaki hayvanlara ise hem KoQ10, hem de PTU uygulaması yapıldı. Deneme sonunda gruplardaki deneklerden genel anestezi altında kardiak punksiyon ile yeterli oranda kan alındı ve plazmaları elde edildi. Elde edilen plazma örneklerinden glikoz, total protein, trigliserit ve total kolesterol düzeyleri belirlendi. Araştırmada, hipotiroidizm oluşturulmasının, kontrol grubu ile kıyaslandığında plazma glikoz ve trigliserit değerlerini düşürdüğü ($p<0,05$), total protein ve total kolesterol düzeylerini arttırdığı ($p<0,05$) gözlemlendi. Çalışmada, KoQ10 tedavisinin (HC grubu), hipotiroidizm oluşturulan ratlar ile kıyaslandığında (H grubu) plazma glikoz, total protein ve trigliserit değerleri üzerinde istatistiksel öneme sahip bir etkisi belirlenemezken, total kolesterol düzeyini artırdığı görüldü ($p<0,05$). Araştırmada KoQ10 (C grubu) uygulamasının, K grubuna göre plazma trigliserit değerlerini azalttığı ($p<0,05$) görüldü. Sonuç olarak hipotiroidide, CoQ10 uygulaması toplam kolesterol düzeyini arttırdığından, metabolik hastalıklarda CoQ10 takviyesinin kan lipit profili üzerindeki etkisi göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: CoQ10, hipotiroidizm, plazma parametreleri, rat, tiroid hormonları.

Introduction

The thyroid gland begins as a rapidly changing process of concentrating iodide in the 11th week of pregnancy and matures rapidly, becoming one of the most important endocrine systems in the human body (Wolmarans, 2017). The thyroid

hormones play a critical role in facilitating normal growth and development while also directing and regulating numerous physiological processes throughout adulthood (Melmed et al., 2015). These include central nervous system (CNS) development,

central and peripheral nervous system signaling, heart function, nutrient metabolism, hepatic metabolism, energy consumption and regulation of body temperature, water and electrolyte balance, and skeletal cycle (Melmed et al., 2015).

Thyroid hormones have a dose-dependent adverse effect on carbohydrate metabolism. As the thyroid hormone level increases in the blood, the absorption of glucose from the intestines and the use of glucose by the tissues increase; glycogenolysis and gluconeogenesis in the liver, skeletal muscle, and cardiac muscle cells are stimulated, and blood glucose level increases (Noyan, 2011). Triiodothyronine (T₃) can cause changes in the energy metabolism of the whole body (Vinales et al., 2019). T₃, which increases the sensitivity of hepatocytes to the glycogenolytic and gluconeogenic effects of epinephrine, indirectly affects hepatic glucose production and increases the use of glucose by muscle cells (Salvatore et al., 2014). Thus, hypothyroidism has a significant effect on an individual's glucose tolerance, post-meal thermogenesis, and sympatho-adrenergic reactions to glucose uptake (Kozacz et al., 2014; Mullur et al., 2014). Thyroid dysfunction may be a risk factor for glucose intolerance (Nishi, 2018), and glucose absorption is impaired in hypothyroidism, peripheral glucose assimilation is delayed, and gluconeogenesis is slower (Duntas et al., 2011).

Thyroid hormone regulation of lipid metabolism, mainly depends on the liver-specific effects of the interactions of T₃, thyroid hormone receptors, and nuclear hormone receptors. Thyroid hormones regulate cholesterol synthesis through many mechanisms (Mullur et al. 2014). The main pathway is the stimulation of transcription of the LDL-R gene by thyroid hormones, resulting in increased cholesterol uptake and cholesterol synthesis (Lopez et al., 2007). Fatty acids induce hepatic thyroid hormone receptor expression and decrease both serum cholesterol and serum triglycerides; however, in the case of hypothyroid, polyunsaturated fatty acid does not induce thyroid hormone receptors, but it causes a decrease in serum cholesterol, resulting in persistent hypertriglyceridemia by stimulating PPAR expression (Souza et al., 2011). In the case of hypothyroidism, it is stated that serum low-density lipoprotein (LDL) and cholesterol levels increase due to the decrease of LDL receptors in the liver (Diekman et al. 1998; Shin and Osborne, 2003). Thyroid hormones stimulate protein conversion (Marcin et al., 2016). The effect of thyroid hormones on protein metabolism differs from the organism's metabolic state and hormone level. Physiological doses of the hormone increase the synthesis rate of the necessary enzymes in oxidative

reactions required for protein synthesis and ultimately create a positive nitrogen balance (Noyan, 2011). Hypothyroidism causes a decrease in protein synthesis and the release of amino acids such as alanine, tyrosine, glycine, and glutamine from skeletal muscles (Marcin et al., 2016).

CoQ10 is an important coenzyme found in the hydrophobic part of all membranes and the mitochondrial inner membrane and is necessary for the activities of enzyme systems involved in oxidation-reduction reactions in the electron transfer chain (Acosta et al., 2016; Alcázar-Fabra et al.; 2016). Under normal conditions, the amount synthesized in the body is sufficient for the body. However, various diseases, aging, and degenerative processes cause this amount to be insufficient for the body (Bhagavan and Chopra, 2006).

In this context, against the negative metabolic effects of hypothyroidism, which has negative effects on many systems in humans and animals and which is endemic both in Turkey and in the world; although it is produced endogenously in the body, it is aimed to determine the effect of CoQ10, for which insufficiency can be observed and has become widely used as a food supplement in recent years, on plasma glucose, total protein, triglyceride and total cholesterol levels in experimental hypothyroidism-induced rats.

Material and Methods

A total of 32 healthy adult male Wistar Albino rats were used as the material in the research. Animals were taken from Selcuk University, Experimental Medicine Research and Application Center. During the research period, the predicted living conditions for the rats were provided as 22±2 °C room temperature, 50±10% relative humidity, and 12/12 night and daylight periods. The animals were fed ad libitum with standard rat feed, and the average amount of water in the rats' daily drink Table was determined (50 ml/day/rat), and their water was refreshed daily during the 10-day adaptation period. The main research period in the study was conducted for a total of 3 weeks.

The rats housed in 8 separate cages (each group divided into two separate cages) as four rats in each cage during the research were divided into four experimental groups as control (K, n=8), CoQ10 (C, n=8), Hypothyroid (H, n=8), and CoQ10+Hypothyroid (CH, n=8).

Control Group (K): No administration was made to the animals in this group, and their feed was given ad libitum during the study, while their daily drinking water was given in the specified amount.

Coenzyme Q10 Group (C): During the trial, approximately 3mg CoQ10 (10mg/kg/day) per animal was administered intraperitoneally by dissolving in 0.3 ml corn oil for this group of rats (Keskin and Uluişik, 2017).

Hypothyroidism Group (H): To induce hypothyroidism in rats, 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) was added to drinking water at the rate of 0.05% weight/volume (w/v) daily throughout the trial (Messarah et al., 2010; Tousson et al., 2012).

Hypothyroidism + Coenzyme Q10 Group (HC): Coenzyme Q10 dissolved in corn oil at an amount of 10mg/kg/day was administered intraperitoneally to the animals in this group throughout the trial. 0.05% of PTU was added to drinking water.

At the end of the research, a sufficient amount of blood was drawn from the subjects in the groups under general anesthesia (70 mg/kg ketamine + 5 mg/kg Rompun) and cardiac punching into EDTA tubes. Plasma was obtained by centrifuging the blood at +4 °C at 3500 rpm (Hettich Rotina 35 R). Total protein, glucose, triglyceride, and total cholesterol levels were determined in the obtained plasma samples. Animals whose blood was drawn were sacrificed by the appropriate euthanasia technique (cervical dislocation). Plasma samples obtained from blood drawn from animals were stored at -20 °C until the analysis is performed. The

study was approved by the Selcuk University Experimental Medicine Research and Application Center Ethics Committee (Report no.2018-49).

Total protein (Siemens, Df73), glucose (Siemens, Df39a), triglyceride (Siemens, Df69a), and total cholesterol (Siemens, Df27) levels were determined spectrophotometrically with the Siemens Centaur CP device as per the kit IFUs (Castelo-Branco et al. 2010).

Statistical analysis of the data obtained at the end of the study was carried out using the SPSS 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) package program. Variance analysis was conducted to determine the importance of intergroup differences in the research. Duncan multiple comparison tests were performed for post hoc analysis (Tekin, 2003).

Results

While the mean plasma GLU value determined in the study was not significant between Group K and C and between Group H and HC, it showed a significant decrease ($p < 0.05$) in both Group H and C compared to Group K and C. In addition, it was observed that the application of inducing experimental hypothyroidism was influential on the average glucose value, while the application of CoQ10 did not cause any change (Table 1 and Figure 1).

Table 1. Plasma average glucose (mg/dl), total protein (g/dl), triglyceride (mg/dl) and cholesterol (mg/dl) values of all groups. (xx±SEM, n=8).

Parameters	K	C	H	HC
GLU	233±16,38 ^a	231,25±10,38 ^a	185,5±12,15 ^b	187,12±11,03 ^b
TP	5,48±0,05 ^b	5,67±0,1 ^b	6,46±0,17 ^a	6,76±0,08 ^a
TG	65,85±3,68 ^a	51,62±6,32 ^b	30,87±1,39 ^c	25,25±2,30 ^c
TC	68,0±1,52 ^c	67,75±1,89 ^c	83,37±4,5 ^b	97,12±4,79 ^a

a,b,c; The difference between the mean values of the same parameter with different letters on the same row is important. ($p < 0,05$).

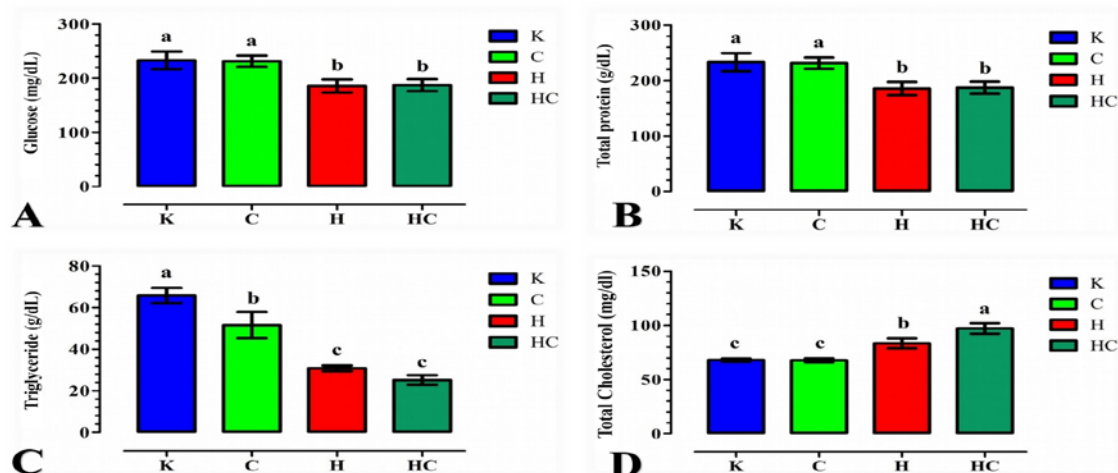


Figure 1. A. Plasma average glucose values B. Plasma average total protein values C. Plasma average triglyceride values, D. Plasma mean total cholesterol values

While the plasma means total protein value determined in the study was not significant between Group K and C and between Group H and HC, it showed a significant increase ($p < 0.05$) separately in both Group H and C compared to Group K and C. It was observed that the application of inducing experimental hypothyroidism was effective on the average total protein value, while the application of CoQ10 did not cause any change (Table 1 and Figure 1).

The mean plasma triglyceride value determined in the research showed a decrease ($p < 0.05$) in Group C, H, and HC compared to that of Group K. The inter-value difference between the Group H and HC was insignificant. The application of inducing experimental hypothyroidism was found to be significantly ($p < 0.05$) effective on the decrease in plasma mean triglyceride value; while the CoQ10 application was found to be significant in Group C compared to Group K ($p < 0.05$), and insignificant in the Group HC compared to Group H (Table 1 and Figure 1)

In this study, while the plasma average total cholesterol value determined was not statistically significant between Group K and Group C; it increased significantly ($p < 0.05$) in both Group H and Group HC compared to the groups in subject (K and C). The increase in Group HC was significant compared to Group H ($p < 0.05$). It was observed that the experimental hypothyroidism application had a significant ($p < 0.05$) effect on the increase of the mean plasma total cholesterol value. Also, application of CoQ10 further increased the increased total cholesterol value in hypothyroidism ($p < 0.05$) (Table 1 and Figure 1).

Discussion and Conclusion

Numerous health benefits of CoQ10 supplementation are reported in the literature. A significant part of the studies on this subject is related to cardiovascular diseases in which the effect of CoQ10 is investigated as a part of medical treatment (Belardinelli et al., 2006; Dłudla et al., 2020; Hernández-Camacho et al., 2018, Mantle and Hargreaves, 2019). Also, CoQ10 is recommended to be used as an auxiliary or protective support agent in the treatment of neurodegenerative diseases and mitochondrial diseases (Yang et al., 2016), neurological diseases such as Parkinson and Huntington (McGarry et al., 2017; Zhu et al., 2017), and diabetes (Samimi et al., 2019) and cancer cases (Abdi et al., 2020; Tafazoli, 2017). Also, in the studies conducted, it was shown that CoQ10 plays a role in stabilizing free radicals due to its powerful antioxidant function, and by this characteristic, it prevents the damage of biomolecules by inhibiting

lipid and protein peroxidation, and it is noted that it is useful as a protective agent in some diseases and as an auxiliary in treatment (Alahmar and Sengupta, 2020; Mousavinejad et al., 2018; Samimi et al., 2019). Even then, the number of researches on the effect of CoQ10 on impaired metabolism and related parameters in hypothyroidism is quite insufficient.

It is emphasized that there is a tendency to increase in serum CoQ10 level in case of hypothyroidism, and there is an inverse correlation between serum CoQ10 level and serum thyroid hormones (fT_3 , fT_4 , rT_3 , and rT_4) levels (Ogura et al. 1980). The reasons for the decrease in CoQ10 levels have been reported as thyroid hormone levels rise, CoQ10 works against tyrosine, the substrate for thyroxine synthesis, and increased use of CoQ10 and increased degradation due to increased metabolic (Polat et al., 2017). Similarly, Pandolfi et al. (1994) reported that the blood CoQ10 levels of patients with hypothyroidism increased, and they emphasized that CoQ10 was inversely related to T_3 but had no relation to T_4 . It is thought that the decrease in T_3 level due to CoQ10 administration may be due to the increased intracellular use of this hormone as a result of accelerated mitochondrial activity (Pandolfi et al., 1994).

In this study, the fact that the plasma glucose, total protein, triglyceride, and total cholesterol levels of the group C given CoQ10 did not differ significantly ($p > 0.05$), and the plasma glucose and triglyceride levels in the group HC given CoQ10 with PTU were statistically lower than in the group K ($p < 0.05$) and total protein level was statistically high ($p < 0.05$) showed that CoQ10 was not effective in correcting the plasma glucose, total protein and triglyceride levels due to hypothyroidism. In the study, the total cholesterol level was found to be statistically higher in the group PTU than in group K and Group C ($p < 0.05$). In the group HC given CoQ10 with PTU, total cholesterol level was found to be statistically higher than all other groups (K, C, and H) ($p < 0.05$) (Table 1).

It is reported that thyroid hormones increase glycogen synthesis in small doses within the context of dose-dependent adverse effects (Cooper et al., 2007; Noyan, 2011). It is also reported that basal metabolism slows down, and gluconeogenesis decreases in hypothyroidism (Comte et al., 1990; Marchesini et al., 1993). These reports support the decrease in mean plasma glucose level achieved in the hypothyroidism group in the study. The decrease determined in plasma glucose level in group H may be due to the decrease in phosphorylase kinase and lysosomal α -oxidase activity in the liver, and thus glycogenolysis due to the decrease in T_3 level, and may also be due to a

decrease in gluconeogenic enzyme activities such as phosphoenolpyruvate, carboxykinase, and pyruvate carboxylase, and decreased susceptibility to glycogenolysis and gluconeogenesis in hepatocytes. The reports that CoQ10 administration does not affect plasma glucose and the result obtained in the study are similar (Kismali, 2009). (Table 1 and Figure 1).

Thyroid hormones are necessary for cells to synthesize structural proteins and specific enzymes, therefore for growth. It was reported that the role of thyroid hormones on protein metabolism is biphasic, catabolic in high concentrations, and anabolic in low concentrations (Trajkovic-Arsic et al., 2010). It was reported that hyperthyroidism prevents protein synthesis, accelerates protein catabolism, and increases nitrogen excretion, and the hormone administered in physiological doses increases protein synthesis (Noyan, 2011) also. In hypothyroidism, it was reported that in patients whose basal metabolic rate and protein synthesis and degradation decrease, a positive nitrogen balance occurs, protein permeability of capillaries increases, and protein level increases in effusions (Hayase et al., 1991). In the study, the increase in total protein level in group H compared to the group K group was attributed to the increase in the synthesis rate due to protein degradation. The increase in the total protein level determined in group H compared to group K in the study does not match with the reports that there is no change in the parameter in question (Kandir and Keskin, 2016; Kismali, 2009) (Table 1 and Figure 1).

The general conclusion in the literature is that plasma total cholesterol and triglyceride levels increase in hypothyroidism. Lipoprotein lipase (LPL) plays a central role in plasma lipid metabolism, hydrolyzing triglycerides in lipoproteins and releasing fatty acids for tissues (Beigneux et al., 2019). Lipoprotein lipase activity is increased by thyroid hormone, so the triglyceride level may increase in hypothyroidism (Lam et al., 1986). However, Ness et al. (1998) reported that plasma triglycerides decreased by 60% as a result of thyroidectomy in rats. The results we obtained in our study showed that the decrease in triglyceride level in the hypothyroidism-induced group compared to the control group showed that more detailed studies are needed on this subject. Also, it was observed in our research that PTU administration caused an increase in total cholesterol levels in group H compared to group K, which was similar to the reports of many researchers (Cooper et al., 2007; Meisinger et al., 2014; Ness et al., 1998).

Although the main reason for CoQ10's effect on lipid profile is unknown, several mechanisms by which CoQ10 supplements can improve lipid profiles are reported. As an intracellular antioxidant, CoQ10 protects cell membrane phospholipids and mitochondrial membrane protein against damage caused by free radicals (Singh et al. 2007). Aldehyde derivatives from lipid peroxidation such as malondialdehyde inhibit free cholesterol esterifying, lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on HDL-cholesterol. Hence, CoQ10 can support the production of HDL-cholesterol, suppress oxidative stress, and reduce malondialdehyde levels (McCall et al. 1995). Besides, CoQ10 supplementation activates the calcium-mediated AMP-activated protein kinase pathway (AMPK, the molecule that stimulates mitochondrial biogenesis, glucose transport, and free fatty acid oxidation) and provides inhibition of differentiation-induced adipogenesis (Lee et al., 2012). According to the findings we obtained in our study, although plasma triglyceride level in group C treated with CoQ10 tended to decrease compared to group K, this difference was not significant ($p>0.05$). Although the plasma triglyceride level of Group HC is statistically the lowest ($p<0.05$) and the total cholesterol level is statistically the highest ($p<0.05$) differs from other literature reports (Table 1 and Figure.1), this may be since the duration of experimental hypothyroidism is only three weeks. Hypothyroidism patients who require urgent intervention are patients with thyroid hormone insufficiency for a long time.

In this study, it was determined that CoQ10 administration decreased the mean plasma triglyceride level in group C compared to group K and increased the mean plasma cholesterol level in group HC compared to group H. Also, literature data on the effect of CoQ10 on lipid profile differ. It was concluded that the difference in the data obtained in the study and from the current literature might be due to the differences in the use, dosage, and duration of use of CoQ10 and the species used as material. Conducting a detailed and sufficient number of researches on the subject will ensure that the subject can be discussed more scientifically.

Acknowledgments

This manuscript was compiled from the project supported by Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator.

References

- Abdi S, Montazeri V, Garjani A, Shayanfar A, Pirouzpanah S, 2020: Coenzyme Q10 in association with metabolism-related AMPK/PFKFB3 and angiogenic VEGF/VEGFR2 genes in breast cancer patients. *Mol Biol Rep*, 47 (4), 2459-2473.
- Acosta MJ, Fonseca LV, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, Salviati L, 2016: Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *BBA-Bioenergetics*, 1857(8), 1079-1085.
- Alahmar AT, Sengupta P, 2020: Impact of Coenzyme Q10 and Selenium on Seminal Fluid Parameters and Antioxidant Status in Men with Idiopathic Infertility. *Biol Trace Elem Res*, 1-7.
- Alcázar-Fabra M, Navas P, Brea-Calvo G, 2016: Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *BBA-Bioenergetics*, 1857(8), 1073-1078.
- Beigneux AP, Allan CM, Sandoval NP, Cho GW, Heizer PJ, Jung RS, Stanhope KL, Havel PJ, Birrane G, Meiyappan M, 2019: Lipoprotein lipase is active as a monomer. *PNAS-USA*, 116(13), 6319-6328.
- Belardinelli R, Muçaj A, Lacalaprice F, Solenghi M, Seddaiu G, Principi F, Tiano L, Littarru GP, 2006: Coenzyme Q10 and exercise training in chronic heart failure. *Eur Heart J*, 27 (22), 2675-2681.
- Bhagavan HN, Chopra RK, 2006: Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic. Res*, 40 (5), 445-453.
- Castelo-Branco C, Steinvarcel F, Osorio A, Ros C, Balasch J, 2010: Atherogenic metabolic profile in PCOS patients: role of obesity and hyperandrogenism. *Gynecol Endocrinol*, 26 (10), 736-742.
- Comte B, Vidal H, Laville M, Riou J-P, 1990: Influence of thyroid hormones on gluconeogenesis from glycerol in rat hepatocytes: a dose-response study. *Metab Clin Exp*, 39 (3), 259-263.
- Cooper D, Greenspan F, Ladenson P, 2007: Hyperthyroidism and Thyrotoxicosis. *Greenspan's basic and clinical endocrinology*, 8th edition : 248-252.
- Diekman T, Demacker PN, Kastelein JJ, Stalenhoef AF, Wiersinga WM, 1998: Increased oxidizability of low-density lipoproteins in hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(5): 1752-1755.
- Dludla PV, Nyambuya TM, Orlando P, Silvestri S, Mxinwa V, Mokgalaboni K, Nkambule BB, Louw J, Muller CJ, Tiano L, 2020: The impact of coenzyme Q10 on metabolic and cardiovascular disease profiles in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrinol Diabetes Metab*, 3 (2), e00118.
- Duntas LH, Orgiazzi J, Brabant G, 2011: The interface between thyroid and diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology*, 75 (1), 1-9.
- Hayase K, Yonekawa G, Yokogoshi H, Yoshida A, 1991: Triiodothyronine administration affects urea synthesis in rats. *J Nutr*, 121 (7), 970-978.
- Hernández-Camacho JD, Bernier M, López-Lluch G, Navas P, 2018: Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease. *Front Physiol*, 9, 44.
- Kandir S, Keskin E, 2016: Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on hematological parameters in rats. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 63 (4), 371-376.
- Keskin E, Uluisik D, 2017: Hematological effects of Coenzyme Q10 in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eurasian J Vet Sci*, 33 (3), 167-71.
- Kismali G, 2009: Effects of Coenzyme Q10 on blood biochemistry in rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (2), 191-194.
- Kozacz A, Grunt P, Steczkowska M, Mikulski T, Dąbrowski J, Górecka M, Sanocka U, Ziemia AW, 2014: Thermogenic effect of glucose in hypothyroid subjects. *Int J Endocrinol*, 308017-308017.
- Lam KS, Chan MK, Yeung RT, 1986: High-density lipoprotein cholesterol, hepatic lipase and lipoprotein lipase activities in thyroid dysfunction effects of treatment. *QJM-INT J MED*, 59 (2), 513-521.
- Lee SK, Lee JO, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, Sha J, Kim SJ, Lee YW, Kang HJ, 2012: Coenzyme Q10 increases the fatty acid oxidation through AMPK-mediated PPAR α induction in 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Signal*, 24 (12), 2329-2336.
- Lopez D, Abisambra Socarrás JF, Bedi M, Ness GC, 2007: Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *BBA*; 1771(9): 1216-1225.
- Mantle D, Hargreaves I, 2019: Coenzyme Q10 and degenerative disorders affecting longevity: an overview. *Antioxidants*, 8 (2), 44.
- Marchesini G, Fabbri A, Bianchi G, Motta E, Bugianesi E, Urbini D, Pascoli A, Lodi A, 1993: Hepatic conversion of amino nitrogen to urea nitrogen in hypothyroid patients and upon L-thyroxine therapy. *Metab Clin Exp*, 42 (10), 1263-1269.
- Marcin G, Maria S, Marcin RT, Krzysztof L, Magdalena G, Łukasz K, Marcin S, Piotr W, 2016: Content of selected amino acids in the gastrocnemius muscle during experimental hypothyroidism in rats. *J Vet Res*, 60 (4), 489-493.
- McCall MR, Tang JY, Bielicki JK, Forte TM, 1995: Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15 (10), 1599-1606.
- McGarry A, McDermott M, Kiebertz K, de Blicke EA, Beal F, Marder K, Ross C, Shoulson I, Gilbert P, Mallonee WM, 2017: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in Huntington disease. *AAN*, 88 (2), 152-159.
- Meisinger C, Ittermann T, Tiller D, Agger C, Nauck M, Schipf S, Wallaschofski H, Jørgensen T, Linneberg A, Thiery J, 2014: Sex-specific associations between thyrotropin and serum lipid profiles. *Thyroid*, 24 (3), 424-432.
- Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, 2015: Williams Textbook of Endocrinology E-Book. *Elsevier Health Sciences*.
- Messarah M, Boumendjel A, Chouabia A, Klibet F, Abdennour C, Boulakoud MS, Feki, AE, 2010: Influence of thyroid dysfunction on liver lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Exp Toxicol Pathol*, 62, 301-310.
- Mousavinejad E, Ghaffari MA, Riahi F, Hajmohammadi M, Tiznobeik Z, Mousavinejad M, 2018: Coenzyme Q10

- supplementation reduces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activity in children with autism spectrum disorders. *Psychiatry Res*, 265, 62-69.
- Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA, 2014: Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews*, 94 (2), 355-382.
- Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood Jr HJ, 1998: Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo AI gene expression. *Biochem Pharmacol*, 56 (1), 121-129.
- Nishi M, 2018: Diabetes mellitus and thyroid diseases. *Diabetology International*, 9 (2), 108-112.
- Noyan A, 2011: Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji.(1. Baskı). İstanbul: Palme Yayıncılık : 483-488.
- Ogura F, Morii H, Ohno M, Ueno T, Kitabatake S, Hamada N, Ito K, 1980: Serum coenzyme Q10 levels in thyroid disorders. *Horm Metab Res*, 12 (10), 537-540.
- Pandolfi C, Ferrari D, Stanic I, Pellegrini L, 1994: Circulating levels of CoQ10 in hypo- and hyperthyroidism. *Minerva Endocrinol*, 19 (3), 139-142.
- Polat M, Polat Y, Akbulut T, Cinar V, Marangoz I, 2017: The effects of trainings applied with CoQ10 and zinc supplementation on the thyroid hormone metabolism in Soccer players. *Biomed.Res.*, 28 (16),7070-7075.
- Salvatore D, Simonides WS, Dentice M, Zavacki AM, Larsen PR, 2014: Thyroid hormones and skeletal muscle—new insights and potential implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 10 (4), 206-214.
- Samimi F, Baazm M, Eftekhari E, Rajabi S, Goodarzi MT, Mashayekhi FJ, 2019: Possible antioxidant mechanism of coenzyme Q10 in diabetes: impact on Sirt1/Nrf2 signaling pathways. *Res Pharm Sci*, 14 (6), 524.
- Shin D-J, Osborne TF, 2003: Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2). *J Biol Chem*, 278 (36), 34114-34118.
- Singh U, Devaraj S, Jialal I, 2007: Coenzyme Q10 supplementation and heart failure. *Nutr Rev*, 65 (6), 286-293.
- Souza LL, Cordeiro A, Oliveira LS, de Paula GS, Faustino LC, Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC, 2011: Thyroid hormone contributes to the hypolipidemic effect of polyunsaturated fatty acids from fish oil: in vivo evidence for cross talking mechanisms. *J Endocrinol*, 211 (1), 65-72.
- Tafazoli A, 2017: Coenzyme Q10 in breast cancer care. *Future Oncology*, 13 (11), 1035-1041.
- Tekin M, 2003: Örneklerle bilgisayarda istatistik. SÜ Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya
- Tousson E, Ali EM, Ibrahim W, Mansour MA, 2012: Treatment with folic acid ameliorated the histopathological alterations caused by propylthiouracil- induced hypothyroid rat testes. *Toxicol Ind Health*, 28 (6), 566-76.
- Trajkovic-Arsic M, Müller J, Darras VM, Groba C, Lee S, Weih D, Bauer K, Visser TJ, Heuer H, 2010: Impact of monocarboxylate transporter-8 deficiency on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in mice. *Endocrinology*, 151 (10), 5053-5062.
- Vinales KL, Begaye B, Bogardus C, Walter M, Krakoff J, Piaggi P, 2019: FGF21 is a hormonal mediator of the human “thrifty” metabolic phenotype. *Diabetes*, 68 (2), 318-323.
- Wolmarans DW, 2017: Maintaining euthyroidism: fundamentals of thyroid hormone physiology, iodine metabolism and hypothyroidism. *S Afr Fam Pract*, 59 (4), 11-21.
- Yang X, Zhang Y, Xu H, Luo X, Yu J, Liu J, Chang RC-C, 2016: Neuroprotection of coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Curr Top Med Chem*, 16 (8), 858-866.
- Zhu Z-G, Sun M-X, Zhang W-L, Wang W-W, Jin Y-M, Xie C-L, 2017: The efficacy and safety of coenzyme Q10 in Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neurol Sci*, 38 (2), 215-224.

*Correspondence: Ali Osman İNAN

Republic Of Turkey, Ministry Of National Education, Akşehir, Konya, Turkey

e-mail: ali.osmn.inn@hotmail.com

Bazı Vahşi Kuşlarda *Trichinella* spp. Larvasının Araştırılması

Oya GİRİŞGİN^{1,a,*}, Ahmet Onur GİRİŞGİN^{2,b}, Çetin Volkan AKYOL^{2,c}, Nurgül ÇİMENLİKAYA^{3,d},
Betül SAYGIN^{3,e}

¹Bursa Uludağ Üniversitesi, Karacabey Meslek Yüksekokulu, Karacabey, Bursa, Türkiye.

²Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Nilüfer, Bursa Türkiye.

³Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nilüfer, Bursa, Türkiye.

^aORCID: 0000-0001-9896-1093, ^bORCID: 0000-0002-0020-2708, ^cORCID: 0000-0001-6522-6746,

^dORCID: 0000-0001-9727-0522, ^e ORCID: 0000-0002-3190-1261

Geliş Tarihi: 12.04.2021

Kabul Tarihi: 01.06.2021

Özet: Zoonoz bir hastalık olan trişinelloz hastalığının etkeni *Trichinella* spp. larvaları, genelde memelilerde ve bazen kuşlarda bulunmaktadır. Etkenin Türkiye'deki dağılımı daha çok yaban domuzlarıyla olmakla birlikte, yaban hayatta diğer memelilerle de olabilmektedir. Larvalar kuşlarda da bulunabildiğinden dolayı, bu çalışma, kuzeybatı Türkiye'deki bazı yabani kuşlarda *Trichinella* spp. larvalarının varlığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, hayvan hastanesine tedavi amacıyla getirilen ve ölen 59 yabani kuşa nekropsi yapılarak, göğüs kaslarında larva varlığı, yapay sindirim tekniği ile araştırılmıştır. Örneklerdeki muhtemel pozitifliği teyit etmek amacıyla, aynı zamanda her örnek ayrıca Trişinoskop ile de muayene edilmiştir. Yapılan muayeneler sonucunda hiçbir kuşun göğüs kasında *Trichinella* spp. larvalarına rastlanmamıştır. Larva tespiti yapılmadığı için, tür teşhisine yönelik herhangi bir moleküler çalışma da yapılamamıştır. Çalışmamız, Türkiye'deki yabani kuşlarda *Trichinella* spp. larvalarının varlığının araştırılmasına yönelik ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Bursa, *Trichinella* spp., Yabani kuşlar.

Investigation of *Trichinella* spp. Larvae in Some Wild Birds

Abstract: *Trichinella* spp. larvae of the zoonotic trichinellosis may occur mainly in mammals either birds. The distribution area of the agent is influenced by the introduction of this pathogen strongly by wild boars and other wild mammals in the wildlife of Turkey. Since larvae can also be found in birds, we surveyed to detect this parasite in wild birds in northwest Turkey via examining breast muscles from 59 wild birds by artificial digestion. Each sample was examined under the stereomicroscope after the digestion protocol. At the same time, every sample was examined separately by the Trichinoscope to support possible positivity. As a result of this investigation, none of the larvae were detected in sampled birds. Because of no larva detection, none of a specific molecular test was performed. This is the first documentation about the presence of *Trichinella* larvae in birds in Turkey.

Keywords: Bursa, *Trichinella* spp., Wild birds.

Giriş

Trişinelloz, *Trichinella* türlerinin larvalarını bulunduran etlerin veya et ürünlerinin çiğ veya az pişmiş olarak yenmesi sonucu oluşan, dünyadaki yaygın zoonoz hastalıklardan biridir. Bu cinse ait nematodlar, Antarktika hariç tüm dünyada memelilerin, kuşların ve sürüngenlerin parazitidir. Kırsal döngüde bulunan hayvanlardan kemirgenler, kara ve kutup ayıları, yaban domuzu, porsuk, kurt, tilki, büyük kediler, sırtlan, çakal gibi yırtıcılar başta olmak üzere, yabani kuşlar da hastalığın epidemiyolojisinde rol oynamaktadır. Enfeksiyon, taze veya çürümüş hayvan leşlerinde bulunan kist içindeki larvaların alınması veya bazı enfekte hayvanların dışkılarının yenmesi ile gelişmektedir. Hastalık insanlara, evcil veya yabani domuzlar, karnivorlar (örn; ayı, köpek, porsuk, mors) ve atlara ait et/et ürünlerinin çiğ veya az pişmiş olarak yenmesiyle bulaşmaktadır (Pozio, 2005; 2007;

2015). *T. pseudospiralis* türü, hem memeliler hem de kuşlarda bulunabilen tek türken, diğer *Trichinella* türleri memelilerde veya sürüngenlerde bulunmaktadır (Pozio, 2005). Türkiye'de domuz eti tüketimi dinsel nedenlerden dolayı çok azdır. Raporlanan insan trichinellosis vakalarının hepsinin yaban domuzu kökenli olması, vahşi yaşamdan avlanan yaban domuzlarının bir kısım halk tarafından yendiğini göstermektedir.

Türkiye'de özellikle domuz ve domuzdan elde edilen gıda ürünlerinde *Trichinella* larvalarının varlığına yönelik birçok araştırma yapılmasına rağmen (Aypak ve ark., 2013; Bostan ve ark., 1999; Heper ve ark., 2005; Şenlik ve ark., 2011), kırsal döngüde bulunan yabani kuşlardaki larva varlığına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Bursa il sınırları içerisinde bulunan, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Hastanesine tedavi

amacıyla getirilen yabancı kuşların göğüs kaslarında *Trichinella* spp. larvalarının varlığı araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma yapılmadan önce, kuşlar üzerinde yapılacak uygulamalar için Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (No:2015-

06/03) ve T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı'ndan (29.06.2015, No: 138216) gerekli izinler alınmıştır.

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine Haziran 2015-Ocak 2019 tarihleri arasında halk tarafından yaralı olarak getirilen ve tedaviye rağmen ölen yabancı kuşlar, bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Toplamda 17 cinse ve 19 türe ait 59 adet yabancı kuş, *Trichinella* spp. larvaları yönünden muayene edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada incelenen kuş türleri ve sayıları

Kuş ismi (Lat)	Kuş ismi (TR)	n
<i>Buteo buteo</i>	Şahin	12
<i>Passer domesticus</i>	Bayağı serçe	9
<i>Larus michahellis</i>	Gümüş martı	9
<i>Ciconia ciconia</i>	Leylek	4
<i>Pica pica</i>	Saksağan	4
<i>Tyto alba</i>	Peçeli baykuş	3
<i>Corvus monedula</i>	Küçük karga	3
<i>Apus apus</i>	Ebabil	3
<i>Falco tinnunculus</i>	Kerkenez	2
<i>Falco eleonora</i>	Ada doğanı	1
<i>Circaetus gallicus</i>	Yılan kartalı	1
<i>Apus melba</i>	Ak karınlı ebabil	1
<i>Upupa epops</i>	İbibik	1
<i>Corvus corone</i>	Kara leş kargası	1
<i>Caprimulgus europaeus</i>	Çoban aldatan	1
<i>Columba livia</i>	Kaya güvercini	1
<i>Anthus trivialis</i>	Ağaç incirkuşu	1
<i>Corvus cornix</i>	Leş kargası	1
Toplam		59

Kuşların tür teşhisleri Heinzl'in (1995) tanımladığı kriterlere göre yapılmıştır. Kuşlar genel nekropsi kurallarına göre açılarak göğüs (pektoral) kaslarından, kuşun büyüklüğüne göre 2-4 gr'lık parçalar alınmıştır. Her bir kas örneği *Trichinella* larvalarının varlığı yönünden, manyetik karıştırıcı yapay sindirim tekniğiyle incelenmiştir (European commission regulation 2075/2005; Gamble ve ark, 2000). Sindirim sıvılarındaki larvaların varlığı stereomikroskop (Nikon SMZ 10) altında $\times 35$ büyütmede muayene edilmiştir. Ayrıca ikinci bir muayene yöntemi olarak, her kuşun ortalama 1 gramlık göğüs etleri ince parçalar halinde kıyılarak Trişinoskop lamı arasında ezilmiş ve aynı mikroskop

altında aynı büyütmede muayene edilmiştir (Kaya, 2003).

Bulgular

Bu çalışma süresince Bursa il sınırları içerisinde bulunarak hayvan hastanesine tedavi amacıyla getirilen ve ölen 59 yabancı kuşun göğüs kasları *Trichinella* spp. larvalarının varlığı yönünden muayene edilmiştir. Gerek sindirim tekniğiyle gerekse trişinoskop lamında yapılan muayeneler sonucunda örneklerin hiçbirisinde *Trichinella* spp. larvalarına rastlanmamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Dünyada yaygın olarak görülen zoonoz hastalıklardan biri olan Trişinelozis; memeliler, kuşlar ve sürüngenlerde bulunan *Trichinella* türlerinin larvaları tarafından oluşturulur. Zoonoz karakterli hastalık olması, *Trichinella* spp. larvalarının hayvanlarda bulunma oranının araştırılması ve bilinmesi yönünden önem arz etmektedir.

Trichinella spiralis'in orijini Doğu Asya olup, muhtemelen ticaret yolu ile Avrupa'ya yayılmış, Avrupa kolonizasyonu sırasında ikinci milenyumun başlarında Amerika, Yeni Zelanda ve Hava'i'ye de yayılım gösterdiği belirtilmiştir (Pozio, 2019).

Türkiye'de ilk Trişinelozis vakası 1977 yılında Merdivenci (1977) tarafından bildirilmiştir. Kastamonu'da avlanan yaban domuzunun İstanbul'da bulunan bir aile tarafından satın alınması ve tüketilmesi sonucunda on üç kişinin enfekte olduğu tespit edilmiştir. 2003 yılında Bursa'da yabani domuz eti yemiş olan yedi kişinin klinik semptomlar göstermesi üzerine yapılan testlerle Trişinelozis varlığı tespit edilmiştir (Heper ve ark., 2005). Mart 2004'te İzmir'de çiğ köfte tüketim öyküsü bulunan 474 kişiden 154'üne Trişinelozis tanısı konmuştur (Türk ve ark., 2006). İki bin beş yılında İzmir'de Trişinelozisden şüphelenilen 76 çocuğun 47'sinin seropozitif olduğu belirlenmiştir (Ozdemir ve ark., 2005). Şubat 1997'de İstanbul'da Bulgaristan'dan getirilen yabani domuz etinden yapıldığı belirlenen sosislerde *Trichinella* spp. larvalarına rastlanmıştır (Bostan ve ark., 1998).

Türkiye'de hayvanlarda *Trichinella* spp. prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalar yetersizdir. İlk olarak Rommel (1971) tarafından Ankara Polatlı'da 70 yaban domuzunda yapılan çalışmada, domuzların sadece bir tanesinde *Trichinella* spp. enfeksiyonu tespit edilmiştir. 1979-1983 yılları arasında 535 evcil domuz, 1165 yaban domuzu ve 600 domuz ürünü incelenmiş ve sadece 1165 yaban domuzunun ikisinde *Trichinella spiralis* bulunmuştur (Nazlı, 1985). 2007-2008 yılları arasında Bursa'da 27 yaban domuzu üzerinde yapılan çalışmada *Trichinella* spp. larvaları saptanmamıştır (Senlik ve ark., 2011). Aypak ve arkadaşları (2013), 2007-2009 tarihleri arasında Aydın İlinde avlanan 43 yaban domuzunda *Trichinella* spp. varlığını araştırmış ve domuzların hiçbirisinde *Trichinella* spp. larvalarına rastlanmamıştır. Türkiye'de yaban hayatındaki kurtlarda yapılan çalışmada ilk defa *Trichinella britovi* tespit edilmiştir (Erol ve ark., 2020).

T. pseudospiralis, hem memelileri hem de kuşları enfekte etmektedir (Pozio ve Murrell, 2006). İnsanda 2000 yılında Fransa'da, 2015'te İtalya'da tespit edilmiştir (Gómez-Morales ve ark., 2021; Ranque ve ark., 2000). Avrupa'da yapılan çeşitli

çalışmalardan elde edilen 90 adet *T. pseudospiralis* izolatının %61'inin evcil ve yabani domuzlardan %39'unun ise karnivorlardan izole edildiği bildirilmiştir (Pozio, 2019). Kuşlarda *T. pseudospiralis*'in oluşturduğu ilk doğal enfeksiyon 1980 yılında Shaikenov (1980) tarafından bildirilmiştir. Lindsay ve ark. (1995) Alabama'da bir siyah akbabanın göğüs ve trakeal kaslarında *T. pseudospiralis* larvalarını tespit etmiştir. Pozio (1999), İtalya'da alaca baykuş ve küçük baykuşun göğüs kaslarında, Hurnikova ve arkadaşları (2014) ise İsveç'te alaca baykuşun pektoral kaslarında *T. pseudospiralis* larvalarına rastlamıştır. İtalya'da 2012-2013 yılları arasında 678 saksagan ve 120 leş kargasında yapılan çalışmada *T. pseudospiralis* larvası araştırılmış ancak hiçbir kuşta varlığı tespit edilememiştir (Mancianti ve ark., 2020). Çalışmamızda larva tespiti yapılamadığından dolayı, tür teşhisine yönelik moleküler teşhis yöntemi uygulanamamıştır.

Çalışmamız, Türkiye'deki yabani kuşlarda *Trichinella* spp. larvalarının varlığının araştırılması yönünden yapılan ilk çalışmadır. Etkenin zoonoz özelliği dikkate alındığında, Türkiye'deki varlığına yönelik farklı bölgelerde yeni araştırmalar yapılmalıdır.

Kaynaklar

- Aypak S, Aysul N, Bakırcı S, Karagenç T, 2013: Aydın ilinde avlanan yaban domuzlarında *Trichinella* sp. varlığının araştırılması. *Animal Health Prod and Hyg*, 2 (2), 203 – 205.
- Bostan K, Akkaya H, Vuruşaner C, Aksu H, 1999: Fermente bir sucukta *Trichinella spiralis* olgusu. *Türk Parazitoloj Derg*, 23, 194-198.
- Erol U, Danyer E, Sarimehmetoğlu HO, Utuk AE, 2021: First parasitological data on a wild grey wolf in Turkey with morphological and molecular confirmation of the parasites. *Acta Parasit*, 66, 687–692.
- European Commission Regulation (EC) 2075/2005, 2005: Laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union*, 338, 60-82.
- Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K, Gajadhar AA, van Knapen F, Noeckler K, Schenone H, Zhu X, 2000: International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet Parasitol*, 93 (3–4), 393-408.
- Gómez-Morales MA, Mazzarello G, Bondi E, Arenare L, Bisso MC, Ludovisi A, Amati M, Viscoli C, Castagnola E, Orefice G, Magnè F, Pezzotti P, Pozio E, 2021: *Zoonoses Public Hlth*, 68, 29–37.
- Heinzel H, Fitter R, Parslow J, 1995: Pocket Guide to Birds of Britain & Europe with North Africa & the Middle East. Harper Collins Publishers Ltd, UK.

- Heper Y, Yilmaztepe F, Komitova R, Akalin H, Vutova K, Helvacı S, 2005: A trichinosis outbreak caused by wild boar meat in Turkey. *Parasite*, 12, 191-192.
- Hurnikova Z, Hrcckova G, Agren E, Komorova P, Forsman J, Chovancova B, Molnar L, Letkova V, 2014: First finding of *Trichinella pseudospiralis* in two tawny owls (*Strix aluco*) from Sweden. *Helminthologia*, 51 (3), 190-197.
- Kaya G, 2003: Parazitoloji Temel İlkeler ve Laboratuvar Teknikleri. M. Kemal Üniversitesi Yayınları No:16, MKÜ Basımevi, Hatay, 146.
- Lindsay DS, Zarlenga DS, Gamblet HR, Al-Yaman F, Smith PC, Blagburn BL, 1995: Isolation and characterization of *Trichinella pseudospiralis* garkavi, 1972 from a black vulture (*Coragyps atratus*). *J. Parasitol.*, 81 (6), 920-923.
- Mancianti F, Terracciano G, Sorichetti C, Vecchio G, Scarselli D, Perrucci S, 2020: Epidemiologic survey on *Toxoplasma gondii* and *Trichinella pseudospiralis* infection in corvids from Central Italy. *Pathogens*, 9, 336.
- Merdivenci A, Aleksanyan V, Girişken G, Perk M, 1977: Türkiye'de insanda ve yabani domuzda *Trichinella spiralis* enfeksiyonu olgusu. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 3, 46-71.
- Nazlı B, 1983: Türkiye'de evcil ve yabani domuzlar ile bunlardan hazırlanan et preparatlarında *Trichinella spiralis*'in mevcudiyeti üzerine araştırmalar. Doktora tezi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ozdemir D, Ozkan H, Akkoç N, Onen F, Gurler O, Sari I, Akar S, Birlik M, Kargı A, Ozer E, Pozio E, 2005: Acute trichinellosis in children compared with adults. *Pediatr Infect Dis J*, 24, 897-900.
- Pozio E, Goffredo M, Fico R, La Rosa G, 1999: *Trichinella pseudospiralis* in sedentary night-birds of prey from Central Italy. *J Parasitol*, 85 (4), 759-761.
- Pozio E, Zarlenga DS, 2005: Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int J Parasitol*, 35 (11-12), 1191-1204.
- Pozio E, Murrell KD, 2006: Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv in Parasit*, 63, 367-439.
- Pozio E, 2007: World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol*, 149, 3-21.
- Pozio E, 2015: *Trichinella* spp. Imported with live animals and meat. *Vet Parasitol*, 213, 46-55.
- Pozio E, 2019: *Trichinella* and *Trichinellosis* in Europe. *Vet Glasnik*, 73 (2), 65-84.
- Ranque S, Faugère B, Pozio E, La Rosa G, Tamburrini A, Pellissier JF, Brouqui P, 2000: *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. *Emerg Infect Dis*, 6, 543-547.
- Rommel M, 1971: Trichinose beim schwarzwild in der provinz Ankara. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 18, 219-221.
- Shaikenov B, 1980: Spontaneous infection of birds with *Trichinella pseudospiralis* garkavi, 1972. *Folia Parasitol (Praha)*, 27, 227-230.
- Senlik B, Cirak VY, Girisgin O, Akyol CV, 2011: Helminth infections of wild boars (*Sus scrofa*) in the Bursa province of Turkey. *J Helminthol*, 85, 404-8.
- Türk M, Kaptan F, Türker N, Korkmaz M, El S, Özkaya D, Ural S, Vardar I, Alkan MZ, Coskun NA, Turker M, Pozio E, 2006: Clinical and laboratory aspects of a trichinellosis outbreak in İzmir, Turkey. *Parasite*, 13, 65-70.

*Yazışma Adresi: Oya Girişgin

Bursa Uludağ Üniversitesi, Karacabey Meslek Yüksekokulu, Karacabey, Bursa, Türkiye.

e-mail: oyagirisgin@uludag.edu.tr

A Case of Apocrine Sweat Gland Adenocarcinoma in a Tabby Cat

Funda Terzi^{1,a,*}, Elif Doğan^{2,b}, Ayşe Başak Kapçak^{2,c}

¹Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Kastamonu, Turkey

²Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Kastamonu, Turkey

^aORCID: 0000-0002-6184-5408, ^bORCID: 0000-0003-0819-8843, ^cORCID: 0000-0002-5796-5298

Geliş Tarihi: 22.09.2020

Kabul Tarihi: 11.01.2021

Abstract: In this report, clinical, radiological, macroscopic and histopathological findings of apocrine sweat gland adenocarcinoma are presented in a 13-year-old male tabby cat. In clinical examination, soft tissue masses were detected in the caudal abdomen and left tuber coxae. Upon radiological examination, subcutaneous masses with the appearance of soft tissue contrast were detected and the masses were surgically removed under general anesthesia. The sizes of the masses were approximately 2x2x3 cm in the caudal abdomen and approximately 1x1x2 cm in the tuber coxae region. The cross-section of the mass was whitish-yellow in color. After the masses were fixed in 10% formaldehyde solution, a routine histopathology procedure was applied. In histopathological examination, apocrine sweat glands in a cystic structure and extensions from the center of the cyst to the lumen were determined, and anisonucleosis, anisocytosis and anaplastic cells with giant nuclei were observed in the epithelial cells of the gland facing the lumen. A diagnosis of papillary-cystic type apocrine sweat gland adenocarcinoma was made with these findings.

Keywords: Apocrine sweat gland, Carcinoma, Cat.

Tekir Bir Kedide Apokrin Ter Bezi Adenokarsinomu Olgusu

Özet: Bu raporda 13 yaşlı, erkek, tekir ırkı bir kedide apokrin ter bezi adenokarsinomunun klinik, radyolojik, makroskopik ve histopatolojik bulguları sunulmuştur. Hayvanın klinik muayenesinde kaudal abdomen ve sol tuber coxae bölgesinde deri altı yerleşimli yumuşak doku kitleleri tespit edildi. Radyolojik muayenede yumuşak doku kontrastlı görünümünde deri altı kitleler saptandı ve genel anestezi altında cerrahi olarak kitleler uzaklaştırıldı. Kitlelerin boyutları kaudal abdomende yaklaşık 2x2x3 cm, sol tuber coxae bölgesinde ise yaklaşık 1x1x2 cm ebatlarında idi. Kesit yüzü beyazımsı-sarı renkli görünümde olan kitleler %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin histopatoloji prosedürü uygulandı. Histopatolojik incelemede apokrin ter bezlerinin kistik yapıda olduğu ve kistin ortasından lümeneye doğru uzantıların yer aldığı, bezin lümeneye bakan epitel hücrelerinde anizonükleozis, anizositosis ile dev nükleuslu anaplastik hücreler bulunduğu görüldü. Bu bulgularla papiller-kistik tipte apokrin ter bezi adenokarsinomu tanısı konuldu.

Anahtar Kelimeler: Apokrin ter bezi, Karsinom, Kedi.

Introduction

Skin sweat glands are classified into 2 types: apocrine and eccrine (Sato et al., 1987). Eccrine sweat glands are commonly found in hairless areas of the body and they regulate body temperature. Apocrine sweat glands secrete odorous fluid rather than regulating body temperature (Girgin et al., 2008).

Apocrine sweat gland tumors can be benign and malignant. Apocrine carcinoma is a malignant tumor that originates from the apocrine secretory epithelium (Khodakaram-Tafti et al., 2012). It has been reported that apocrine sweat gland adenocarcinoma accounts for 0.7-2.2% of all skin-related tumors in dogs and 3.2% in cats (Khodakaram-Tafti et al., 2012). The peak incidence is between the ages of 8 and 12 in dogs, and between 5 and 15 years in cats. No sex predilection has been noted (Goldschmidt and Hendrick, 2002).

Apocrine sweat gland adenocarcinoma is seen in the groin and axillary areas in dogs and cats, as well as in the perioral region in cats (Goldschmidt and Hendrick, 2002). It is classified histologically as solid, tubular, and cystic (Ginn et al., 1993). Apocrine sweat gland tumor spreads both through lymphatic and vascular ways and can metastasize to the regional lymph node, lung, liver, and bone (Ginn et al., 1993; Baharak et al., 2012).

In this case we described radiological, macroscopic, and histopathological findings of a feline apocrine sweat gland adenocarcinoma.

Case Description

A 13-year-old, male cat was referred to the Veterinary Clinic at the Kastamonu University with a 6 month history of swelling in the caudal abdominal and left tuber coxae region. The animal owner

reported that these swellings gradually became larger and that there was no other disorder in the general condition of the animal.

Upon physical examination, solid soft masses were observed in the caudal abdomen (one mass) and on the left tuber coxae region (two masses) (Figure 1). Routine hemogram was performed and no abnormality was detected. Radiography revealed that the subcutaneous mass had soft tissue contrast (Figure 2). Additionally, metastasis-suspected areas were identified in the left caudal lobe of the lungs (Figure 2). No biopsy or lobectomy was performed in areas where metastasis was suspected.

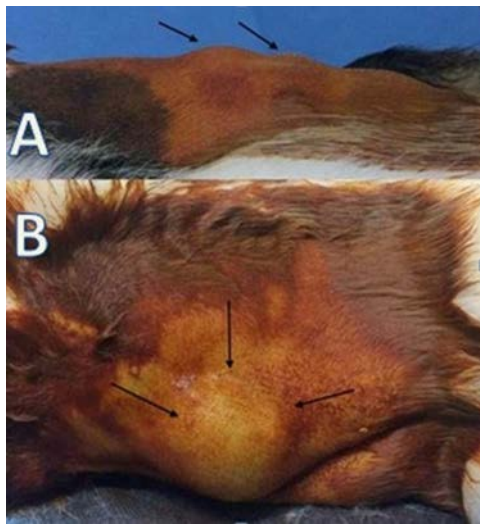


Figure 1. Clinical or presurgical view of the masses (A: masses in the left tuber coxae, B: mass in caudal abdomen)

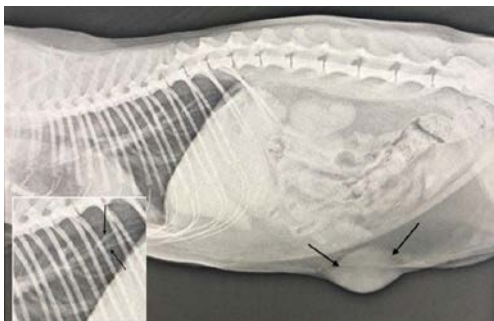


Figure 2. Radiographic view of the mass in the caudal abdomen and metastatic masses in the left caudal lobe of the lung (metastatic masses are seen in the inset)

After physical and radiological examinations, surgical extirpation of the masses was planned under general anesthesia. Anesthesia was induced with a combination of xylazine HCl (1 mg/kg IM, 2% Rompun, Bayer, Istanbul, Turkey) and ketamine HCl (20 mg/kg IM, 10% Ketazol, Richter Pharma, Austria). Respiratory rate, heart rate and rectal temperature were monitored before and during anesthesia (mean respiratory rate 20/min, mean

heart rate 95/min, mean rectal temperature 38.5 °C). The cat was positioned in left lateral recumbency and surgical site was prepared normally. After making incisions on the masses, they were removed by blunt dissection. Subcutaneous tissue was closed with simple continuous sutures. Finally, the incision line was closed with a simple separate interruption. Meloxicam (0.1 mg/kg, orally, q24h, Bavet, Istanbul) and synulox (1 ml/20 kg SC, Zoetis 40 ml, Italy) was used for 3 days after surgery. Sutures were removed on the tenth day postoperatively. Since the owner of the animal was out of town after the operation, phone calls were made every two months and it was learned that there was no recurrence and the general condition of the cat was good.

The masses were approximately 2x2x3 cm in the caudal abdomen and 1x1x2 cm at the level of the left tuber coxae region and both masses were surrounded with a fibrous capsule. It was determined that the mass with a whitish-yellow cross-sectional surface had cystic structures with centrally located cavities (Figure 3).



Figure 3. Macroscopic image of the mass removed from the caudal abdomen (apocrine sweat gland adenocarcinoma)

The masses were fixed in 10% formaldehyde solution for histopathological examination. After fixation, tissues were blocked in paraffin for routine histological staining procedure. Five µm thick sections were taken from the paraffin blocks and stained with hematoxylin-eosin (H&E). In the histopathological examination an increase in the fibrovascular connective tissue was observed between the glands in the dermis layer. Anaplastic cell formations were found in glandular and myoepithelial cells. Apocrine sweat glands were found to have cystic structure, and finger-like projections towards the lumen were detected (Figure 4). In these papillary appendages, atypical cell structures and tumor-type giant cells were seen (Figures 4 and 5). Anisonucleosis, anisocytosis and

anaplastic cells with giant nuclei were detected in the luminal epithelial cells of the sweat glands. Few mitotic figures were encountered with an increase in the number of nucleoli (Figure 5).

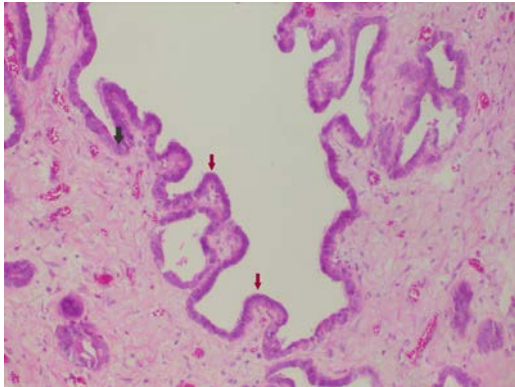


Figure 4. Papillary extension (red arrows) and giant nucleus (black arrow), apocrine sweat gland adenocarcinoma, skin. H&E x 200

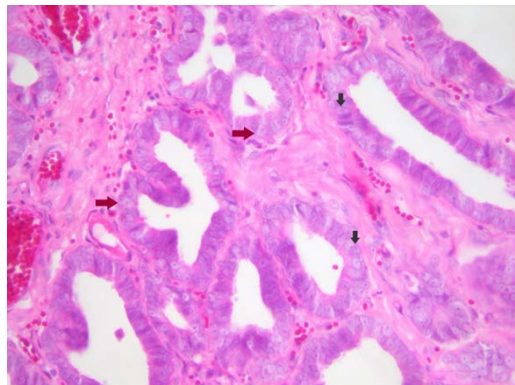


Figure 5. Giant nucleus (red arrows), anaplastic cell and increase in the number of nucleoli (black arrows), apocrine sweat gland adenocarcinoma, skin. H&E x400

Discussion and Conclusion

Apocrine sweat gland adenocarcinoma has been reported in dogs, cats, cows, monkeys, mice, and other animal species (Khodakaram-Tafti et al., 2012; Matthias et al., 2012; Tessele et al., 2015). Apocrine carcinoma accounts for 3.2 % of cat skin tumors, and it is more common in Siamese and tabby cats, and less in domestic short-haired cats (Goldschmidt and Hendrick, 2002; Haziroğlu et al., 2014). The tumor is seen in cats between the ages of 5 and 15, especially over 10 years of age (Goldschmidt and Hendrick, 2002). Haziroğlu et al. (2014) reported that apocrine sweat gland adenocarcinoma can be seen in tabby cats between the ages of 2.5 and 3. In our case, feline apocrine carcinoma was found to be within the age limits stated by Goldschmidt and Hendrick (2002). This tumor is seen in both male and female cats

(Goldschmidt and Hendrick, 2002; Kalaher et al., 1990). In our case report, the tumor was detected in a male cat.

Apocrine sweat gland adenocarcinoma has usually been reported on inguinal, axillary regions (Goldschmidt and Hendrick, 2002), the head, neck, trunk, abdomen, and limbs in cats and dogs (Haziroğlu et al., 2014; Miller et al., 1991). Similar to other studies, one of the masses was detected in the caudal abdomen. However, the other masses were detected in the tuber coxae region on our clinical examination. As seen in the present case, the tumor can metastasize to different regions. Therefore, clinical examinations of these patients should be done carefully in order not to miss the metastatic tissues.

Apocrine gland carcinoma spreads both by lymphatic and vascular pathways and metastasizes to regional lymph nodes, lung, liver, and bone tissues (Baharak et al., 2012). In the radiological examination of this case, nodules were found in the left caudal lobe of the lung. This nodule was evaluated as an apocrine sweat gland adenocarcinoma metastasis.

In cats and dogs, the size of the tumor nodule can be less than 1 cm (Goldschmidt and Hendrick, 2002). However, in recent case reports, it has been reported that the size of the tumor is larger than 1 cm in dogs (Baharak et al., 2012; Khodakaram-Tafti et al., 2012). In our case, the size of the tumor was more than 1 cm (approximately 2x2x3 cm in the caudal abdomen, and approximately 1x1x2 cm in tuber coxae region).

The World Health Organization classifies apocrine sweat gland tumors in domestic animals as adenoma/carcinoma, complex or mixed adenoma/carcinoma (or both) and ductal adenoma/carcinoma (Goldschmidt and Hendrick, 2002; Nibe et al., 2005). Histopathologically, apocrine carcinoma can be of solid, tubular, and papillary-cystic structure (Ginn et al., 1993). In our case, the tumor had a cystic-papillary structure histopathologically. In apocrine carcinoma, cell cytoplasm is eosinophilic, while nuclei are oval, hyperchromatic, and pleomorphic. Also, a large number of mitotic figures are encountered (Goldschmidt and Hendrick, 2002). In this case, atypical cell morphology was detected in the apical faces of the sweat gland epithelial cells, and the apocrine sweat gland adenocarcinoma of these cells was found to be compatible with histological findings.

In the treatment of localized apocrine gland carcinoma, curative treatment, regional lymph node dissection, wide local excision and postoperative radiotherapy in patients with poorly differentiated tumors are applied (Chamberlain et al., 1999). In

our case, after the disease was diagnosed, the detected masses were deeply extirpated by making a wide incision.

In the phone calls made with the animal owner, it was learned that no new masses were formed in the postoperative period.

In this case report, clinical, radiological, macroscopic, and histopathological findings of apocrine sweat gland adenocarcinoma were described in a 13-year-old tabby cat. It is concluded that by reporting similar cases in cats, useful information about the diagnosis and treatment of this tumor can be obtained.

References

- Baharak A, Reza K, Shahriar D, Omid A, Daruoosh V, Nasrin A, 2012: Metastatic apocrine sweat gland adenocarcinoma in a terrier dog. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(8), 670-672.
- Chamberlain RS, Huber K, White JC, Travaglino-Parda R, 1999: Apocrine gland carcinoma of axilla: review of the literature and recommendation for treatment. *American Journal of Clinical Oncology*, 22 (2), 131-135.
- Ginn PE, Mansett JEKL, Rakich PM, 1993: Skin and appendages. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Maxie MG (ed), 757-758, Academic Press, San Diego.
- Girgin A, Alabay B, Liman N, Özfiliz N, Gülmez N, Özcan Z, Yörük M, Erdost H, Aslan Ş, Ergün L, Zık B, 2008: Örtü Sistemi. In: Veteriner Özel Histoloji, Özer A (ed), 117-133, Nobel Basımevi, Ankara.
- Goldschmidt M, Hendrick M, 2002: Tumors of Skin and Soft Tissues. In: Tumors in Domestic Animals, Meuten DJ (Ed), 45-117, Iowa State Press, Iowa.
- Haziroğlu R, Haligur M, Keles H, 2014: Histopathological and immunohistochemical studies of apocrine sweat gland adenocarcinomas in cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12 (1), 85-90.
- Kalaher K, Anderson W, Scott D, 1990: Neoplasms of the apocrine sweat glands in 44 dogs and 10 cats. *Vet Rec*, 127 (16), 400-403.
- Khodakaram-Tafti A, Khub A, Shirian S, 2012: Pathology and immunohistochemical characteristics of apocrine sweat gland adenocarcinoma in a dog. *Comparative Clinical Pathology*, 21 (2), 237-239.
- Matthias N, Lockworth CR, Zhang F, Lee MH, Yeung SCJ, Tsai KY, Hamir AN, 2012: Multiple cystic sweat gland tumors in transgenic mice. *Comparative Medicine*, 62 (1), 27-30.
- Miller M, Nelson S, Turk J, Pace L, Brown T, Shaw D, Fischer J, Gosser H, 1991: Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Vet Pathol*, 28 (5), 389-395.
- Nibe K, Uchida K, Itoh T, Tateyama S, 2005: A case of canine apocrine sweat gland adenoma, clear cell variant. *Vet Pathol*, 42 (2), 215-218.
- Sato K, Leidal R, Sato F, 1987: Morphology and development of an apocrine sweat gland in human axillae. *American Journal of Physiology*, 251, 167-180.
- Tessele B, Rissi DR, Langohr IM, Vielmo A, Barros CS, 2015: Mixed apocrine adenocarcinoma of the tail in a cow. *Braz J Vet Pathol*, 8 (2), 72-75.

*Correspondence: Funda TERZİ

Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Kastamonu, Turkey
e-mail: fundaterzi@kastamonu.edu.tr

Chronic Uterine Infection Caused by Fetal Retention and Treatment by Unilateral Ovariohysterectomy in a Dog

Cevdet PEKER^{1,a,*}, Eyyüp Hakan UÇAR^{1,b}, Güneş ERDOĞAN^{1,c}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

^aORCID: 0000-0002-2150-0640, ^bORCID: 0000-0002-8988-3158,

^cORCID: 0000-0002-9807-810X

Geliş Tarihi: 26.02.2021

Kabul Tarihi: 05.04.2021

Abstract: A four-year-old Anatolian Shepherd bitch was brought to our clinic with an intermittent purulent-hemorrhagic vaginal discharge complaint with no general symptoms for six months following the last parturition. There were no signs of mass or lesion on the vaginal wall during physical examination. Anechoic uterine content, hyperechoic structures freely floating in the lumen, and suspicious fetal tissue remnants were detected by ultrasonography in only the left uterine horn. Hematological parameters revealed the chronic uterine infection. The unilateral ovariohysterectomy operation was performed for the more affected left horn to maintain the patient's fertility. Two fetal bone remnants were detected in the reddish infectious uterine content at the postsurgical uterine incision. Throughout the postoperative five months, vaginal discharge or any general signs of complication were not observed. We thought that the last fetus might have undergone uterine retention and autolysis in the following weeks, which caused the chronic uterine infection. Obstetrical controls are well-advised in all parturitions to reveal any fetal remnant cases/complications and to have a normal postpartum process.

Key words: Bitch, debris, fetal death, uterine infection.

Bir Köpekte Fetal Retensiyonun Neden Olduğu Kronik Uterus Enfeksiyonu ve Tek Taraflı Ovaryohistektomi ile Tedavisi

Özet: Dört yaşında Anadolu Çoban köpeği, son doğumdan itibaren altı aydır genel hastalık semptomlarının bulunmadığı aralıklı purulent hemorajik vajinal akıntı şikayeti ile kliniğimize getirildi. Fiziki muayenede vajina duvarında herhangi bir kitle veya lezyona rastlanmadı. Ultrasonografi aracılığıyla sadece sol kornu uteride anekojenik uterus içeriği ile fetal doku kalıntılarını şüphelendiren ve lumen içerisinde serbestçe yüzen hiperekoik yapılar tespit edildi. Hematolojik parametreler kronik uterus enfeksiyonunu göstermekteydi. Hastanın fertilitasını devam ettirmek için daha şiddetli enfeksiyonun görüldüğü sol kornu uteriye unilateral ovariohistektomi operasyonu uygulandı. Postoperatif uterus ensizyonunda kırmızımsı enfeksiyöz uterus içeriğinde iki fetal kemik kalıntısı tespit edildi. Postoperatif 5 ay boyunca herhangi bir vaginal akıntı ya da genel komplikasyon belirtisi gözlenmedi. Son fetusun uterusta retensiyona ve sonraki haftalarda otolize uğramış olabileceğini ve bunun da kronik uterus enfeksiyonuna neden olduğunu düşündük. Fetal retensiyon vakaları/komplikasyonlarını ortaya çıkarmak ve olağan bir postpartum süreç için tüm doğumlardan sonra obstetrik kontroller tavsiye edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dişi köpek, fetal ölüm, kalıntı, uterus enfeksiyonu.

Introduction

Fetal retention cases at parturition have been described in the dogs having average parturition history, but the actual incidence is presumed to be low (Feldman and Nelson, 2004). Clinical findings of canine fetal retention/maceration cases are obtained from the sporadic clinical reports (Erdoğan et al., 2019; Fasulkov et al., 2014; Günzel-Apel et al., 2008; Rigau et al., 2011; Serin and Parın, 2009). The condition leads progressively (within hours or days) to uterine infection with severe postpartum metritis accompanied by fetal emphysema (Orfanau et al., 2010). Female dogs exhibit foul and fetid uterine discharge and may become systemically ill, showing the signs of toxemia or septicemia (Feldman and

Nelson, 2004; Ritt and Fossum, 1997). Rare cases were detected with no systemic infection signs in some reports (Fasulkov et al., 2014; Gonzalez Dominguez et al., 2006; Günzel-Apel et al., 2008; Serin and Parın, 2009). In diagnosis, ultrasonographic examinations reveal the hyperechoic fetal debris in the uterine cavity (Erdoğan et al., 2019; Fasulkov et al., 2014; Pharr and Post, 1992; Serin and Parın, 2009). According to fetal debris character and location, prostaglandin injections or different surgical approaches are recommended (Feldman and Nelson, 2004; Günzel-Apel et al., 2008; Serin and Parın, 2009).

This report presented the perioperative clinical findings of a chronic uterine infection caused by fetal debris detected in the sixth month after parturition in a bitch.

Case Description

A four-year-old and 35 kg weighted Anatolian Shepherd bitch was referred to Animal Hospital of Aydın Adnan Menderes University with an intermittent purulent-hemorrhagic vaginal discharge complaint. Ten live puppies were delivered vaginally six months ago in history, but they died in the postparturient ten days. An intermittent purulent-hemorrhagic vaginal discharge was seen since the current parturition, and several palliative antibacterial medical treatments were performed during this period in a private veterinary clinic. Also, no proestrus bleeding and estrus behavior were observed following the current parturition. Clinical examination revealed that the dog was in good condition, and body temperature and pulsation were normal. However, chronic infection signs were seen in hematology (WBC: $20.63 \times 10^3/\mu\text{l}$; LYMP: $0.82 \times 10^3/\mu\text{l}$; MONO: $1.67 \times 10^3/\mu\text{l}$; NEUT: $17.59 \times 10^3/\mu\text{l}$). At the ultrasonography, the left uterine horn diameter was 34 mm, and it was filled with anechogenic uterine

content (Fig. 1), including freely floating hyperechoic structures, suspicious fetal tissue remnants. Nevertheless, the right uterine horn had milder infection signs (less content and uterine dimension) and a smaller diameter (14 mm) (Fig. 2).

Following clinical and ultrasonographic examinations, the patient was diagnosed as chronic endometrial hyperplasia-pyometra complex at first. Instead of the prostaglandin/oxytocin injections, it was decided that the surgical treatment procedure because of the left horn's higher dimension. Unilateral ovariohysterectomy was preferred to protect fertility in subsequent cycles of the bitch. Ventral midline ovariohysterectomy was performed to the bitch under the general anesthesia by using the xylazine [2 mg/kg of Xylazine HCL (Rompun %2, Bayer, Germany)] and ketamine [10 mg/kg of Ketamine HCL (Alfamime %10, Alfasan, Holland)] combination. The left uterine horn and left ovary were removed, peritoneal lavage was performed, respectively. Finally, genital organs, peritoneum, abdominal muscles, and skin were closed separately by absorbable sutures. Postoperatively, two fetal bone fragments belonging to the calvarium and the pelvic arch were detected in the removed horn's purulent uterine content. Besides, the appearance of left ovary was having the persistence of corpora lutea (Fig. 3).

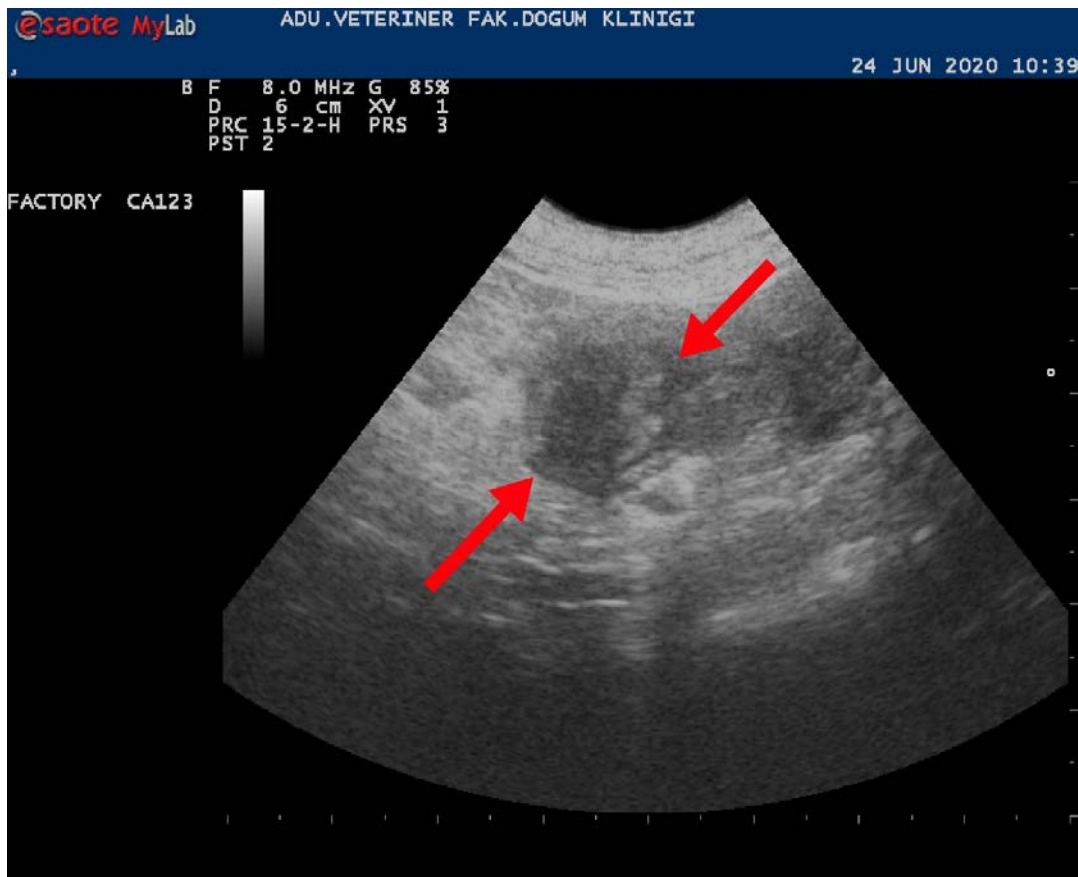


Figure 1. Ultrasonographic appearance of left uterine horn and hyperechoic fetal debris (red arrows)

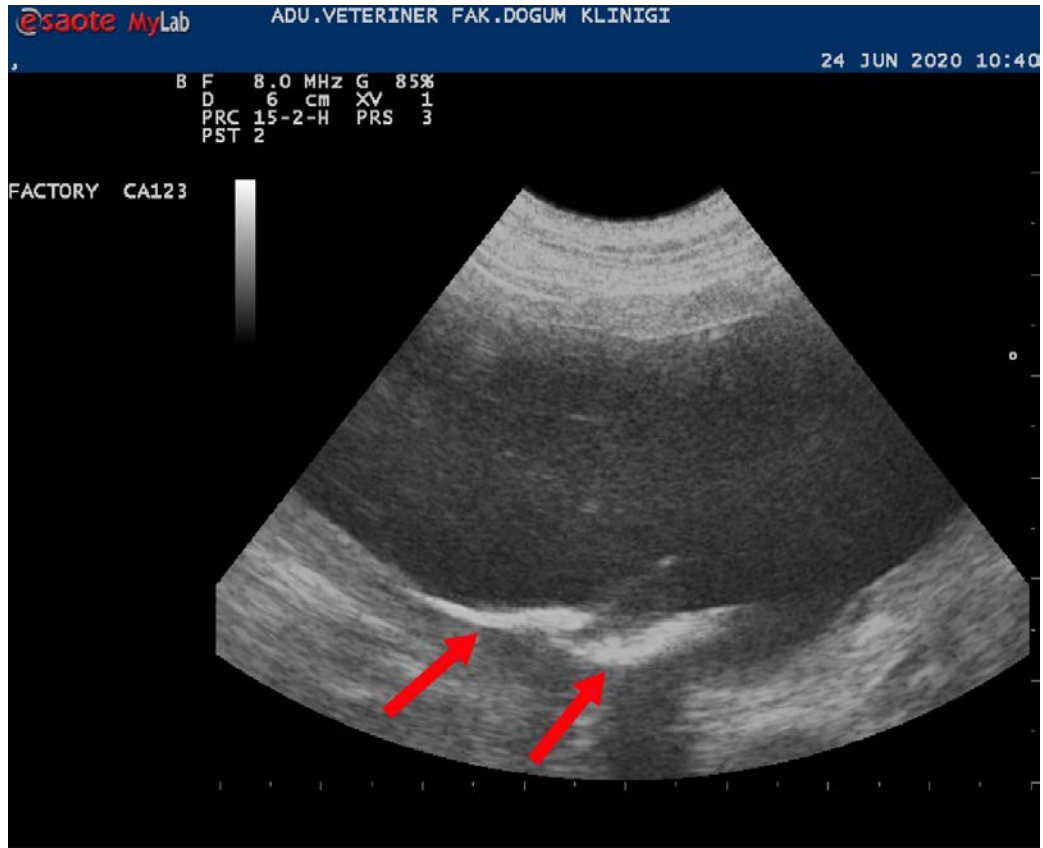


Figure 2. Ultrasonographic appearance of right uterine horn (red arrows)

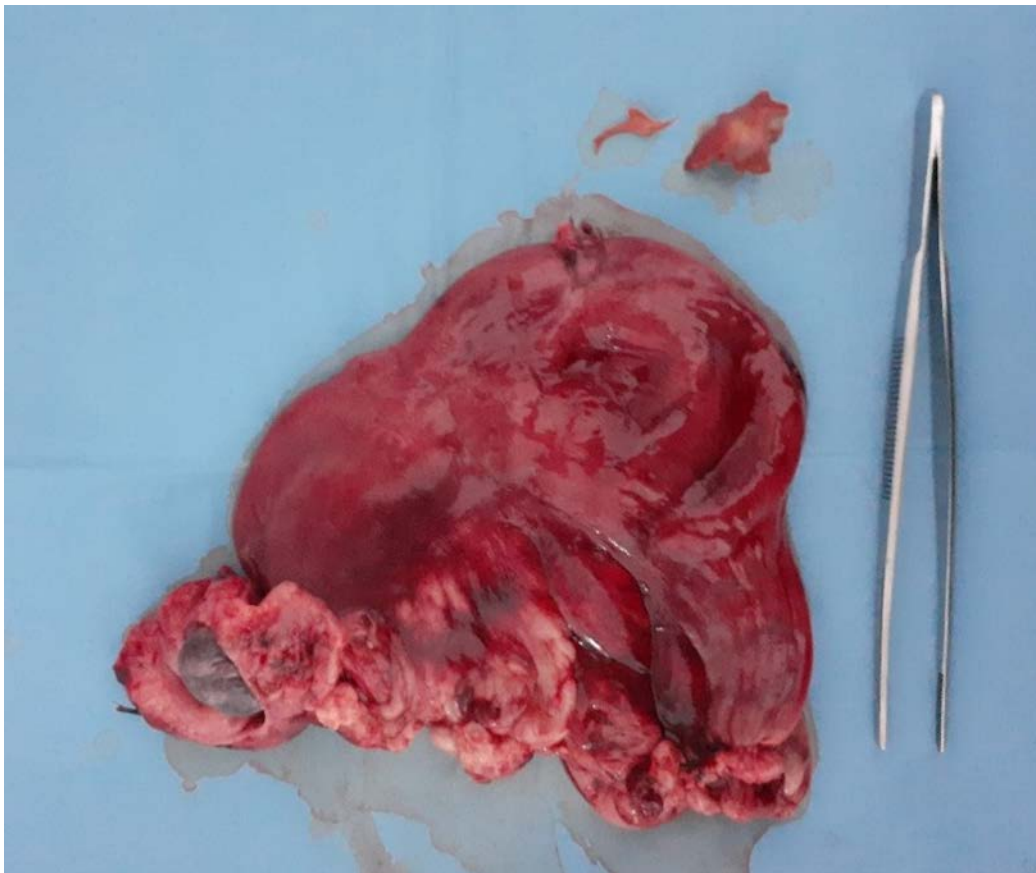


Figure 3. Appearance of removed left uterine horn, left ovary and two fetal bones

Parenteral antibiotic (10 mg/kg, Amoxicillin+Clavulanic acid, Synulox, Zoetis, Italy) was administered subcutaneously for seven consecutive days. One dose of postoperative analgesic (0.2 mg/kg, Meloxicam, Maxicam, Sanovel, Turkey) was also administered. The patient well tolerated the unilateral ovariohysterectomy and recovered uneventfully at the end of the postsurgical first week. No vaginal discharge or complication sign was observed in the bitch throughout the postoperative five months. Although postoperative gynecological scans and hematological analysis were recommended, they could not be performed due not to the owner's demand.

Discussion and Conclusion

In bitch, the incomplete labor is emerged by the lack of uterine contractions, uterine rupture, torsion of the gravid horn, or myometrial suppressing by long-acting progestagen injections in the late proestrus or estrus (Fasulkov et al., 2014; Günzel-Apel et al., 2008; Orfanau et al., 2010; Rigau et al., 2011). The present case's actual reason remained unknown, because there was no external trauma or hormonal approaches in the patient's history. Any systemic signs of a disease could be linked with the last parturition. Besides, both uterine horns were intact at the surgery. The retention of the last fetus could have been resulted in mild uterine inertia in the last stage of the vaginal delivery despite the secretion of maternal oxytocin triggered by other live puppies' suckling behavior.

Fetal retention cases can potentially result in a life-threatening emergency (Günzel-Apel et al., 2008; Ritt ve Fossum, 1997). Also, long-standing retention subsists subclinically and does not give rise to the significant major complications in some rare cases (Erdoğan et al., 2019; Orfanau et al., 2010; Serin and Parin, 2009). Hematological and radiological changes caused by chronic uterine inflammation would be detected after the unusual clinical appearance (loss of appetite, lethargy, etc.), so the diagnosis of these cases may take several months. If detailed pelvic ultrasonography had been performed on the first day of the complaint, the fetal retention the diagnosis of fetal retention would be made earlier in this patient.

Infectious vaginal discharge can reflect various conditions, from simple vaginal flora impairments to complicated uterine infections (Feldman and Nelson, 2004; Golinska et al., 2021; Kustritz, 2006; Kustritz, 2008; Pretzer, 2008). Therefore, it would be said that the proper treatment of genital disorders is not possible without pelvic ultrasonography. Immediate gynecological

ultrasonography is required to evaluate the partial or complete fetal debris in dogs suffering from long-standing vaginal discharge, especially in the first week after birth.

According to the various outcomes of fetal death and cervical dilatation, fetal tissue debris varies in size. Dilated cervix allows the vaginal drainage of the macerated fetus(es) and uterine content and helps the prevention of maternal sepsis (Gonzalez Dominguez et al., 2006; Serin and Parin, 2009). In our case, only two bone remnants were detected in the left uterine horn because vaginal drainage and intermittent antibacterial treatments for six months minimized fetal bone debris. The long anestrus period that lasted for postpartum six months can be explained by developing chronic uterine infection resulting in the persistence of corpora lutea and ovarian suppression. Treatment of canine fetal retention has two main approaches: using uterine ecboic and the partial or complete ovariohysterectomy (Erdoğan et al., 2019; Fasulkov et al., 2014; Feldman and Nelson, 2004; Günzel-Apel et al., 2008). Uterine wall integrity, maternal health condition, sepsis/toxemia, cervical opening, and the degree of embedding the fetal debris to the myometrium are the main factors for choosing the correct treatment protocol. In this case, the uterine infection had disseminated asymmetrically and intensely on the left horn where the dead fetus was located. However, the size and fluid content of the right horn were relatively smaller and in better condition. Therefore, unilateral surgery is recommended as an alternative technique for removing long-standing fetal retention and subsequent fertility recovery (Günzel-Apel et al., 2008). Similar to the previous report, a successful unilateral ovariohysterectomy was performed in the present case to remove the horn that was more affected by fetal bone debris. Therefore, it may be possible for the dog to conceive again and give birth to healthy puppies with this alternative surgery. In addition to this, Seyrek-Intas et al. (2004) reported that the emergence of the subsequent estrus behaviors could be in a wide range of periods (from 1 day to 11 months) following unilateral ovariohysterectomy operation. Therefore, the absence of heat throughout the postoperative five months can be considered normal in our case.

In case of prolonged postpartum vaginal discharge, veterinary clinicians should search for possible obstetric sequelae that can negatively affect maternal fertility and threaten life. Detailed uterine scans are superior in the early diagnosis of obstetric complications in patients without systemic symptoms and may allow individual surgical treatment of the uterine horn separately.

References

- Erdoğan G, Akkuş T, Payan-Carreira R, 2019: An unusual outcome for fetal death in bitch: a report of a case. *J Adv Vet Bio Sci Tech*, 4 (1), 22-25.
- Fasulkov I, Atanasov A, Antonov A, 2014: A clinical case of foetal maceration and posttraumatic uterine rupture in a bitch. *Istanbul Univ Vet Fak Derg*, 40 (2), 264-269.
- Feldman EC, Nelson RW (2004). Canine female reproduction. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, Feldman EC, Nelson RW (Eds), 525-671 WB Saunders, New York.
- Golińska E, Sowińska N, Tomusiak-Plebanek A, Szydło M, Witka N, Lenarczyk J, Strus M, 2021: The vaginal microflora changes in various stages of the estrous cycle of healthy female dogs and the ones with genital tract infections. *BMC Vet Res*, 17 (1), 1-8.
- González MS, Estrada JGM, 2006: Gestación prolongada asociada con la prescripción inadecuada de medroxiprogesterona acetato. ¿ Es racional y ético el uso de progestágenos exógenos en perras?. *RCCP*, 19 (4), 442-450.
- Günzel-Apel AR, Fehr M, Seefeldt A, Reischauer A, Schoon HA 2008: Prolonged Foetal Retention in a Bitch Resulting in Trichogranulomatous Panmetritis and Re-establishment of Fertility After Unilateral Ovariohysterectomy. *Reprod Domest Anim*, 43 (1), 117-120.
- Kustritz MVR, 2006: Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66 (3), 567-574.
- Kustritz MVR, 2008: Vaginitis in dogs: a simple approach to a complex condition. *Vet Med*, 103 (10), 562-567.
- Orfanou DC, Ververidis HN, Boscós CM, Fthenakis GC, 2010: Postpartum pathological conditions in the bitch-Part II. *Eur J Companion Anim Pract*, 20 (2), 119-126.
- Pharr JW, Post K, 1992: Ultrasonography and radiography of the canine postpartum uterus. *Vet Radiol Ultrasound*, 33 (1), 35-40.
- Pretzer SD, 2008: Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. *Theriogenology*, 70 (3), 320-326.
- Rigau T, Rodríguez-Gil JE, García F, Del Alamo MR, 2011: Partial foetal retention following aglepristone treatment in a bitch. *Reprod Domest Anim*, 46 (4), 738-741.
- Ritt MG, Fossum TW, 1997: Successful treatment of uterine torsion and fetal retention in a postparturient Great Pyrenees bitch with septic peritonitis and prothrombotic complications. *J Am Anim Hosp Assoc*, 33 (6), 537-539.
- Serin G, Parin U, 2009: Recurrent vaginal discharge causing by retained foetal bones in a bitch: a case report. *Vet Med (Praha)*, 54 (6), 287-290.
- Seyrek-Intas K, Wehrend A, Nak Y, Tek HB, Yilmazbas G, Gokhan T, Bostedt H, 2004: Unilateral hysterectomy (cornuectomy) in the bitch and its effect on subsequent fertility. *Theriogenology*, 61(9), 1713-1717.

*Correspondence: Cevdet PEKER

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey.

e-mail: cevdet.peker@adu.edu.tr

Veteriner Mikrobiyolojide Hasta/Sürü Yanında Teşhis Yöntemleri

Bengi AKKOYUNLU^{1,a,*}, Barış SAREYYÜPOĞLU^{2,b}

¹Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara, Türkiye.

^aORCID: 0000-0002-0953-3802, ORCID: ^b0000-0002-2212-2610

Geliş Tarihi: 01.04.2021

Kabul Tarihi: 10.06.2021

Özet: Hasta/sürü yanında teşhis yöntemleri, bir hastalığın teşhisinin saha koşullarında hızlı ve doğru bir şekilde yapılmasını amaçlayan yöntemler olarak ifade edilebilir. Geleneksel tanı yöntemleri, yüksek duyarlılık ve özgülüğe sahip olmakla birlikte, uzun tanı süreleri ile iş gücü gereksinimleri ve yüksek maliyetleri nedeniyle, alternatif yöntem arayışlarının doğmasına neden olmuştur. Veteriner Hekimlikte, hayvanlar çoğunlukla merkeze uzak bir konumda bulunduğu için iyi tasarlanmış hasta/sürü yanı teşhis yöntemleri sahada uygulanabilirlik açısından avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, olası bir salgın durumunda hızlı tanının çok kritik bir önemi bulunmaktadır. Bu derlemede hasta/sürü yanında teşhise olanak sağlayan tanı yöntemlerinden ve teknolojilerinden bahsedilmiş, bu yöntemlerin kullanımına ilişkin örnekler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Hasta/sürü yanında teşhis, Hızlı tanı, Tanı yöntemleri, Veteriner Mikrobiyoloji.

Point-of-Care Diagnostic Methods in Veterinary Microbiology

Abstract: Point of care testing methods can be expressed as methods to diagnose the disease quickly and accurately in field conditions. Although traditional diagnostic methods have high sensitivity and specificity, they have led to searching for alternative methods due to their long diagnosis times, labor requirements, and high costs. In veterinary medicine, well-designed patient/herd side diagnosis methods provide advantages in terms of applicability in the field since the animals are mainly located far from the center. In addition, rapid diagnosis is of critical importance in the event of a possible epidemic. In this review, diagnostic methods and technologies that allow diagnosis besides the patient/herd are mentioned, and examples of these methods are presented.

Keywords: Diagnostic methods, Point of care testing, Rapid diagnosis, Veterinary microbiology.

Giriş

Hasta/sürü yanı testleri, sorumlu hekime kolaylıkla ulaştırılabilen, hastanın bulunduğu yerde veya hasta yanında, klinik laboratuvar dışında ve kalıcı bir üniteye ihtiyaç duyulmadan, taşınabilir cihazlar kullanılarak gerçekleştirilen tanı testleri olarak tanımlanır (Lamb ve ark., 1995). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ideal hasta başı testleri; ekonomik, duyarlı, spesifik, kullanıcı dostu (düşük teknik bilgi ve basit birkaç adımlık prosedür ile kullanılabilen), hızlı, özel ekipman gereksinimi bulunmayan ve son kullanıcı için kolay ulaşılabilir testler olmalıdır (Kettler ve ark., 2004).

Hasta/sürü yanında teşhis yöntemleri, laboratuvar tabanlı geleneksel yöntemlere göre büyük avantajlara sahip, umut vaat eden tanı araçlarıdır. Hasta/sürü yanı tanı yöntemlerinin en önemli avantajlarından biri zaman tasarrufu sağlamasıdır. Numunenin toplanması ile tedavi başlangıcı arasındaki süreyi kısaltır. Ayrıca karantina önlemleri gerektiren bulaşıcı hastalıkların hızlı teşhisi ile hastalığın yayılmasını önlemek için gereken önlemlerin en kısa sürede alınabilmesine olanak sağlar. Düşük maliyeti sayesinde özellikle gelişmekte olan ve düşük bütçeye sahip ülkeler için

önemli bir avantaj sağlar. Bu yöntemler veteriner hekimlik alanında kolaylıkla uygulanabilir yapıdadır. Çünkü teste tabi tutulacak hayvanlar tanı laboratuvarının bulunduğu merkeze uzak bir konumda bulunabilir. Numunenin toplanması, laboratuvara gönderilmesi, testin yapılması, sonucun alınması ve gerektiğinde hayvanların tekrar araya toplanması büyük zorluk oluşturabilmektedir (Busin ve ark., 2016).

Bu derleme ile laboratuvar tabanlı geleneksel tanı testlerinin sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldırma potansiyeline sahip ve enfeksiyöz hastalıkların tanısının hasta/sürü yanında, hızlı, güvenilir ve daha düşük maliyetle yapılabilmesine olanak sağlayan tanı teknolojilerinin ve bu teknolojilerin güncel kullanımına ilişkin örneklerin sunulması amaçlanmaktadır.

Test Yöntem ve Teknolojileri

1. Dipstik ve Strip Testler: Bu testler immünojenik işaretleme prensibini kullanmaktadır. Özel sıvıların analizi için pedli kâğıt striplerden

yapılmışlardır. Numune bu striplerle muamele edildikten sonra, sonuç renk kodlu grafikler ile karşılaştırılır ve bu şekilde analitin yarı kantitatif tanısı sağlanır (Busin ve ark., 2016).

Jacob ve ark. (2016) tarafından köpeklerde üriner sistem enfeksiyonunun tespiti için hızlı immün test stripleri geliştirilmiştir. Köpeklerden alınan idrar örnekleri ile stripler muamele edildikten sonra stripler üzerinde oluşan bantlar ve renk yoğunlukları değerlendirilmiştir. Kontrol bandı dışındaki bantların oluşumu, idrardaki bakterinin tipine göre değişmektedir. Birinci bandın oluşumu (ikinci bant ile birlikte veya onsuz), üriner sistem enfeksiyonunun gram negatif bir bakteriden kaynaklandığını gösterir. Yalnızca ikinci bandın oluşumu ise enfeksiyonun, gram tipi belli olmayan bir bakteriden kaynaklandığını gösterir. Geleneksel bakteriyel kültür sonuçları ile bu hızlı test çıktıları arasında büyük uyum görülmüştür.

2. İmmünokromatografik Kart Testler (Yatay Akışlı İmmüno Testler, Lateral Flow Immunoassay): Numune içindeki hedef antijeni, antikor veya çoğaltılmış gen ürününü, pahalı ve amaca özel bir ekipman kullanmaksızın tarayan basit bir cihazdır (Sahoo ve ark., 2016b). Çoğu immünokromatografik kart testi, kalitatif veya yarı-kantitatifdir (Bahadır ve Sezgintürk, 2016). İmmünokromatografik kart testleriyle idrar, serum, plazma ve tam kan gibi çeşitli biyolojik örnekler taranabilir. Hayvan hastalıkları, patojenler ve toksinler bu test ile tespit edilebilir (Koczula ve Gallotta, 2016).

Analiz edilecek sıvı örnek, kapillar güç ile kartın çeşitli alanlarına doğru hareket eder. İmmünokromatografik kart testi; örnek altlığı, konjugat altlığı, tarama alanı ve emici altlık bölümlerinden oluşmaktadır. Örnek altlığı numunenin uygulandığı alandır. Konjugat altlığında; boyalar, floresan partiküller, altın nano partiküller, lateks topları vb. ile işaretlenmiş hedef analite spesifik antijen veya antikorlar bulunur. Tarama alanında, spesifik biyolojik bileşenler (genellikle antikor ve antijenler) nitroselüloz membranda bulunan çizgiler üzerinde sabitlenmiştir. Bunların rolü, işaretli antikor/antijene bağlı analit ile reaksiyon oluşturmaktır (Koczula ve Gallotta, 2016). Test çizgisinin oluşması, hedef antijen veya antikoron varlığına veya yokluğuna göre değişir. Kontrol çizgisi, kart boyunca sıvı akışının doğru olup olmadığını gösterir. Kontrol çizgisi üzerinde, ikincil antikorlar veya protein G/A gibi spesifik yakalama molekülleri sabitlenmiştir. Hedef analit test edilen örnek içinde olsa da olmasa da kontrol çizgisinin oluşması gerekir. Emici altlık da fazla sıvıyı absorbe eder (Sahoo ve ark., 2016b). Sonucun okunması, farklı yoğunluklarda oluşan çizgiler incelenerek yapılır. Bu çıplak gözle veya bir okuyucu vasıtasıyla yapılabilir (Koczula ve Gallotta, 2016).

İmmünokromatografik kart testleri, kullandığı tanıma elementlerine göre; antikor tabanlı ve nükleik asit tabanlı immünokromatografik kart testleri olmak üzere ikiye ayrılır (Bahadır ve Sezgintürk, 2016).

3. Mikro Akışkan Teknolojileri: Son zamanlarda teşhis alanında en umut verici teknolojilerden biri, mikro akışkan (microfluidics) teknolojisidir. Mikro akışkan teknolojinin ana avantajları arasında, taşınabilir olmaları ve reaktiflerin düşük tüketimi sayılabilir. Ayrıca çok düşük bir numune hacminin kullanılması ve dağılıma mesafesinin kısa olması analiz süresini belirgin bir şekilde azaltır (Rattle ve ark., 2013). Test için gerekli bütün adımların tek araçta performans gösterebilmesi de belirgin bir avantaj sağlar. Numunenin ön hazırlığı, analiz, sinyal çoğaltılması ve taranması aynı araçta gerçekleştirilebilir (Chin ve ark., 2007). Ek olarak, mikro akışkan teknolojinin mobil okuyucular ve elektronik bilgi saklama sistemleri ile kombine edilebilmesi hasta/sürü yanı testlerinin gelecek dönem uygulamaları için güzel bir yaklaşım olabilir (Martinez ve ark., 2008).

Mikro total analiz sistemleri ve mikro akışkan kâğıt tabanlı cihazlar olmak üzere iki ana tip mikro akışkan sistem kullanılmaktadır.

Mikro Total Analiz Sistemleri (μ TAS): Bu sistemlerden biri, çip üzerinde laboratuvar (lab on a chip, LOC) olarak adlandırılan sistemdir. Numune hazırlanması ve tarama gibi bir dizi işlevselliği mikro ölçekte bir çip üzerinde bir araya getirebilmektedir (Hardt ve Schönfeld, 2007). Bir diğer sistem ise disk üzerinde laboratuvar (lab on a disc, LOAD) olarak adlandırılan sistemdir. Numune hazırlama, çözeltinin yer değiştirmesi, reaktif karıştırma, ayırma ve taramayı tek bir cihazda birleştiren bir tür santrifüj mikro akışkandır (Wang ve ark., 2021).

Mikro Akışkan Kâğıt Tabanlı Analitik Cihazlar (μ PDAS): Polidimetilsiloksan'dan yapılan geleneksel mikro akışkan cihazların oldukça komplike olmaları ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın kullanıma uygun olamayacak kadar pahalı olmaları nedeniyle süreç içerisinde kâğıt tabanlı mikro akışkan cihazlar gündeme gelmiştir (Martinez, 2011; Sia ve Whitesides, 2003). Yeni nesil basit mikro akışkan cihazların yapımı için kâğıdın seçilmesinin nedeni, uygun fiyatlı bir materyal olması ve ek bir güç kaynağına gereksinim duymadan, kapillar güç ile sıvıyı cihaz içinde hareket ettirme özelliğine sahip olmasıdır (Martinez, 2011).

4. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri: PCR en yaygın kullanılan nükleik asit amplifikasyon tekniğidir (Belák ve Ballagi-Pordány, 1993; Mullis ve Faloona, 1987; Nakajima ve ark., 1992; Sareyyupoglu ve Akan, 2006). Ancak termal döngü cihazı ve uzmanlaşmış personel gereksinimi, rutin tanı laboratuvarlarında büyük bir alan kaplaması

gibi sınırlayıcı faktörler; izotermal nükleik asit amplifikasyonu olarak bilinen yeni bir moleküler-biyolojik tekniğin geliştirilmesini teşvik etmiştir. PCR ve izotermal amplifikasyon arasındaki en büyük fark, reaksiyon ısı gereksinimleri arasındaki farktır. PCR'da belirli sıcaklıklarda termal döngü adımları gerekirken, tüm izotermal amplifikasyon reaksiyonu için tek bir optimal reaksiyon ısı yeterlidir. Bu sayede pahalı ekipman gerekmeksizin uygun reaksiyon koşulları sağlanabilmektedir (Chang ve ark., 2012).

Nükleik asit amplifikasyon tekniklerini mikro akışkan teknoloji ile birleştirmek, moleküllerin düşük konsantrasyonlarını taramak için hızlı, güvenilir ve ekonomik olmalarından dolayı, yeni hasta/sürü yan test teknolojilerinin gelişimi açısından bir fırsat sunmaktadır (Busin ve ark., 2016).

a) İzotermal Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri: Mevcut teknikler; duyarlılık ve özgüllük açısından farklılıklar göstermektedir (Chang ve ark., 2012). Bu tekniklerden biri olan İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça fazladır ve diğer birçok izotermal amplifikasyon yönteminin aksine halihazırda çok sayıda ticari test kiti bulunmaktadır (Craw ve Balachandran, 2012; Karthik ve ark., 2014; Kawai ve ark., 2017; Lalande ve ark., 2011; Pal ve ark., 2018; Yamazaki ve ark., 2009). Çoklu Çapraz Yer Değiştirme Amplifikasyonu (MCDA) ise yeni geliştirilen bir diğer izotermal amplifikasyon tekniğidir ve LAMP ile karşılaştırıldığında umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir (Wang ve ark., 2015). Bu nedenlerden dolayı bu iki izotermal amplifikasyon yönteminden özel olarak bahsedilecektir.

İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP): PCR teknolojisinde, reaksiyon alternatif sıcaklık aşamaları veya döngüleri dizisiyle gerçekleştirilir. Bunun aksine izotermal amplifikasyon sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilir ve termal döngü cihazı gerektirmez. Ayrıca diğer DNA çoğaltma metotları ile karşılaştırıldığında çok düşük miktardaki DNA'yı tespit eder (Sahoo ve ark., 2016a).

Bu teknikte, hedef sekans 60-65 °C arasında sabit bir sıcaklıkta, 2 veya 3 set primer ve yüksek sarmal yer değiştirme aktivitesine ve çoğaltma aktivitesine sahip polimeraz kullanılarak çoğaltılır. Tipik olarak 4 farklı primer, hedef DNA'daki 6 farklı bölgeyi belirlemek için kullanılır, bu durum spesifikiteye katkıda bulunur (Notomi ve ark., 2000). Ek ilmiğe primer (loop primer) çiftlerinin kullanılması reaksiyonu daha da hızlandırır (Nagamine ve ark., 2002). Sonucun değerlendirilmesinde ise farklı teknikler kullanılabilir. Çoğaltılan ürünler, agar jel elektroforezine tabi tutulabilir (Sahoo ve ark.,

2016a). Bulanıklık (türbidite) yoluyla değerlendirilebilir. Bu bulanıklık, amplifikasyon yan ürünü olarak magnezyum pirofosfat miktarının artması ve solüsyonda çökmesi nedeniyle oluşur (Mori ve ark., 2001). Bu durum, özellikle büyük reaksiyon hacimlerinde, kolay bir şekilde çıplak gözle görülebilir. Ayrıca türbitemetreler ile de ölçülebilir. "SYBR Green" gibi DNA bağlayıcı floresan boyalar veya Kalsein ve Hidroksinaftol Mavisi gibi kolorimetrik indikatörler kullanılmasıyla oluşan gözle görülebilir renk değişimi, çıplak gözle pahalı ekipman gerektirmeden değerlendirilebilir (Sahoo ve ark., 2016a; Zhang ve ark., 2014). Çoğaltılan ürünlerin değerlendirilmesi için LAMP tekniğinin, immunokromatografik kart testleri, mikro akışkan cihazlar ve elektrokimyasal biyosensörler ile de birleştirilmesi mümkündür. (Kawai ve ark., 2017; Najian ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2014). LAMP, kısmen işlem görmüş ve/veya görmemiş örneklerden hedef DNA'yı çoğaltma avantajına sahiptir (Sahoo ve ark., 2016a).

Çoklu Çapraz Yer Değiştirme Amplifikasyonu (Multiple Cross Displacement Amplification, MCDA): Sarmal yer değiştirme polimerizasyon reaksiyonunu temel alan bir izotermal amplifikasyon stratejisidir. Bu teknikte, hedef sekansta 10 ayrı bölgeyi tanıyan 10 adet primerden oluşan bir set kullanılmaktadır. Reaksiyon prosesinde kullanılan enzim, sarmal yer değiştirme yeteneğine sahip bir polimerazdır. Amplifikasyon reaksiyonu 61-65 °C arasında sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir. Amplifiye ürünler, LAMP tekniğinde bahsedilen yöntemlerle tespit edilebilir. Floresan tarama reaktiflerinin kullanıldığı kolorimetrik metotlar ile 40 dk içerisinde pozitif amplifikasyonun görsel ayrımının yapılabildiği ifade edilmektedir (Wang ve ark., 2015).

b) Minyatürize Edilmiş PCR Cihazları: Mikro akışkanların, mikro elektro-mekanik sistemler ile kombinasyon halinde ortaya çıkışı, PCR prosesinin bir çipte minyatürize edilmiş şekilde yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Fakat, geleneksel PCR süreçlerinde, termal döngüyü gerçekleştirmek için hassas ısıtma ve soğutma kontrol modüllerinin zorunluluğu nedeniyle, minyatürize edilmiş PCR sistemlerinde, termal özellikleri optimize etmek için daha özel bir tasarım gerekliliği doğmuş ve bu durum maliyeti artırmıştır.

Kantitatif PCR (qPCR)'in ortaya çıkışı ile elektroforez veya hibridizasyon adımları olmaksızın tek bir adımda nükleik asit amplifikasyonu ve kantitatif gerçek zamanlı tarama gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra, hızlı nükleik asit amplifikasyon testini gerçekleştirmek amacıyla geleneksel PCR süreçlerinin basitleştirilmesi ve kısaltılması için, çözülmesi gereken iki temel zorluk ortaya çıkmıştır. Bunlar, geleneksel PCR sistemlerinin

ısıtma/soğutma oranlarının saniyede yalnızca birkaç santigrat derece olması ve tüm PCR prosesinin tamamlanması için 1-2 saatlik bir süre gerekmesidir. Bu durum, hızlı tanı için oldukça yavaştır ve iyileştirilmesi gerekmektedir. İyileştirme için numune hacminin azaltılması seçeneği, düşük maliyeti ve artan ısıtma/soğutma oranları nedeniyle en cazip seçenektir ve mikro akışkanların PCR ile kombinasyonunda çok küçük hacimli numunelerin işlenebilmesi olanağını sağlar (Wang ve ark., 2021).

5. Biyosensörler: Biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal bir sinyali, ölçülebilir ve işlenebilir bir elektriksel sinyale dönüştüren kimyasal veya fiziksel dönüştürücü ile bağlanmış biyolojik algılama elemanı içeren cihazlar biyosensör olarak adlandırılır (Li, 2006). Enzimler, antikorlar, hücreler ve nükleik asitler temel biyolojik algılama elemanları olarak kullanılmaktadır (Leva-Bueno ve ark., 2020). Biyosensörlerin mikro akışkan cihazlar, nükleik asit amplifikasyon teknikleri ve yapay zekâ teknikleri ile kusursuz entegrasyon potansiyeli sayesinde, iş gücü gereksinimini sınırlayan ve “akıllı” teşhis olanak sağlayan hasta/sürü yanı teşhis yöntemlerinin gelişimindeki ilerlemenin hızlanacağı görülmektedir (Wang ve ark., 2021).

a) Optik Biyosensörler: Optik biyosensörün yüzeyine bağlanan hedef analit, sensör yüzeyinin absorpsiyon, lüminesans, floresans gibi optik özelliklerini değiştirerek bir optik sinyal oluşturur ve bu sinyal değerlendirilerek hedef analitin varlığı veya yokluğu saptanır (Ahmed ve ark., 2014). Optik biyosensörler, floresan temelli (indirekt) ve etiketleme gerektirmeyen (direkt) olarak iki kategoriye ayrılır (Ahmed ve ark., 2014; Li, 2006). Floresan temelli optik biyosensörler, hedef moleküller ya da biyolojik algılama moleküllerinin, floresan etiketlerle işaretlenmesi prensibini kullanır. Etiketleme gerektirmeyen optik biyosensörlerde ise hedef moleküller, floresan etiketlerle işaretlenmez veya üzerinde değişiklik yapılmaz ve doğal formlarında tespit edilir (Fan ve ark., 2008).

Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) Tabanlı Biyosensörler: Etiketleme gerektirmeyen optik bir tarama yöntemidir. Bir yüzey plazmon dalgası aracılığıyla, metal yüzeydeki moleküller etkileşimlerin neden olduğu ışığın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçer. Bu biyosensörler, gerçek zamanlı tarama, laboratuvarından bağımsız olma, düşük maliyet, yüksek yeniden kullanım performansı ve tekrarlanabilirlik özellikleri sayesinde hasta/sürü yanı teşhis uygulamaları için en güvenilir tespit yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Bununla birlikte sıvı numune hacimlerinin ve güç tüketim miktarının hala fazla olması nedeniyle iyileştirilmesi gereken tarafları bulunmaktadır (Wang ve ark., 2021).

Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Saçılması Tabanlı Biyosensörler (Surfaced Enhanced Raman Scattering, SERS): Raman saçılması, saçılan fotonun frekansının gelen fotonun frekansından farklı olduğu durumlarda, fotonların inelastik saçılması olgusudur. Raman saçılmasının yüzey zenginleştirilmesi, biyolojik parçaların metal nano partiküllerin yüzeyinde hareketsiz hale getirilmesiyle elde edilebilir ve bu olgu, yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılması olarak bilinir. Bu teknik, Raman saçılması spektrumlarındaki değişimi izleyerek biyolojik etkileşimleri tanımlamak için kullanılır (Chatterjee ve ark., 2019). Raman saçılması spektrumlarındaki bu değişim büyük ölçüde bakteriyel hücre duvarına (peptidoglikan, lipopolisakaritler, membran proteinleri vb.) ve hücre içi küçük molekül salgılarına bağlanmaktadır (Galvan ve Yu, 2018). Raman saçılması tabanlı optik biyosensörler, hedef moleküllerin işaretlenmemesi yönüyle, etiketleme gerektirmeyen optik tarama yöntemlerine benzerken, Raman saçılmasının algılama için kullanılması yönüyle floresan tabanlı optik biyosensörlere benzemektedir (Fan ve ark., 2008).

b) Elektrokimyasal Biyosensörler: Enzimatik reaksiyon sonucunda veya antikor-antijen etkileşimi nedeniyle bir tampon çözeltisinin elektriksel özelliklerinde oluşan değişim çeşitli elektrokimyasal biyosensörler ile ölçülebilmektedir (Bahadır ve Sezgintürk, 2014).

Amperometrik Biyosensörler: Elektro aktif biyolojik bir elementin oksidasyonundan veya redüksiyonundan kaynaklanan akımın ölçülmesini temel alan bağımsız cihazlardır (Sadeghi, 2013).

Potansiyometrik Biyosensörler: Elektrokimyasal potansiyel dönüştürücüye bağlı bir biyolojik algılama elemanı içeren cihazlar olarak tanımlanabilir (Sadeghi, 2013). Bu sensörlerde iyon-seçici elektrot kullanılır. Analitin, çalışan elektrot tarafından tanınması sonucu oluşan potansiyel değişimini ölçerler (Ahmed ve ark., 2014).

İmpedimetrik Biyosensörler: DNA, antikor, aptamer ve çeşitli sentetik afinite proteinleri gibi analite spesifik olarak bağlanan biyolojik algılayıcılar kullanılır (Leva- Bueno ve ark., 2020). Spesifik hedef molekülleri, medyum içerisinde biyolojik algılayıcılar tarafından yakalandığında, moleküler etkileşimler, sensörün impedansında değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler impedimetrik parametreler izlenerek tespit edilir, ölçülür ve analiz edilir (Etayash ve ark., 2014).

c) Manyetik Biyosensörler: Mikro akışkan kanallar içindeki manyetik mikro ve nano partiküllerin magnetodirenç etkisi kullanılarak aranan bakterinin tespit edilmesi temeline dayanan bu biyosensörler, hassasiyet ve boyut bağlamında gelecek vaat etmektedir. Manyetik nano

partiküllerin biyolojik olarak aktif hale getirilmesi için hedef bakteriyi tanıyabilecek antikorlar kullanılır. Pahalı optik bileşenleri ortadan kaldırması ve manyetik alan kullanarak, örnek hazırlama süresini azaltması nedeniyle düşük maliyetli ve gelişmiş tarama etkinliğine sahip biyosensörlerdir. Biyolojik numunelerin ihmal edilebilir manyetik arka plan sinyali nedeniyle, yüksek özgüllük ve duyarlılık sergilemektedirler (Duarte ve ark., 2016; Li, 2006; Wang ve ark., 2021).

d) Mekanik Biyosensörler

Kuartz Kristal Mikrobalans Sensörler: Analitin bağlanmasından dolayı, sensör yüzeyinde artan kütleden kaynaklanan rezonans frekans değişimlerini ölçer. Etiketleme gerektirmeyen bir tespit yöntemidir (Ahmed ve ark., 2014).

Tablo 1'de hasta/sürü yanı teşhis yöntemlerinin kullanımına ilişkin çeşitli örnekler sunulmuştur.

Tablo 1. Hasta/sürü yanında teşhis yöntemlerinin kullanımına ilişkin örnekler.

Etken	Tanı Yöntemi	Tarama Limiti	Örnek Türü	Referanslar
<i>Brucella canis</i> (Antikor)	İmmüno-kromatografik kart testi	-	Serum	Cortina ve ark. (2017)
<i>Salmonella Typhimurium</i> ve <i>Salmonella Choleraesuis</i>	Entegre Mikro Akışkan Elektrokimyasal DNA Çipi	~100 cfu/ml	Kan	Patterson ve ark. (2013)
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Boncuk-Temelli Mikro Akışkan İmmün Test	-	Serum	Wadhwa ve ark. (2012)
<i>Borrelia burgdorferi</i> (İnsan çalışması)	Mikro akışkan İmmün Test	-	Kan	Nayak ve ark. (2016)
<i>Coxiella burnetii</i>	LAMP	10 pg DNA/ µl (PCR ile aynı)	Abortif materyal	Raele ve ark. (2015)
<i>Brucella abortus</i>	LAMP	7 pg/µl DNA	Fötüs mide içeriği, kan	Karthik ve ark. (2014)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Disk üzerinde laboratuvar formatında LAMP	10 ³ cfu/ml	Balgam	Loo ve ark. (2016)
<i>Leptospira interrogans</i>	MCDA	10 genomik eşdeğer	Saf kültür	Li ve ark. (2019)
<i>Escherichia coli</i>	Mikro Akışkan PCR cihazı	0.7 ng/ µl	Saf kültür	Salman ve ark. (2020)
<i>Vibrio cholerae</i>	SPR Temelli İmmüno-sensör	43 hücre/ml	Saf Kültür	Taheri ve ark. (2016)
<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>MRSA</i>	SERS Temelli Biyosensör	5×10 ² hücre/ml	Saf Kültür	Wang ve ark. (2018)
<i>M. tuberculosis</i>	Amperometrik Biyosensör	100 cfu/ml	Balgam	Hiraiwa ve ark. (2015)
<i>E. coli</i>	Potansiyometrik Biyosensör	6 cfu/ml	Süt	Zelada-Guillén ve ark. (2010)
<i>Listeria monocytogenes</i>	İmpedimetrik Biyosensör	10 ³ cfu/ml	Saf kültür	Etayash ve ark. (2014)
<i>S. Typhimurium</i>	Kuartz Kristal Mikrobalans Biyosensörü	10-20 cfu/ml	PBS	Salam ve ark. (2013)

Sonuç

Sonuç olarak hasta/sürü yanı testleri saha koşullarında kısa sürede patojenin tespitine olanak sağlayarak hızlı tanıya ve buna bağlı olarak, hızlı ve doğru tedaviye imkân vermektedir. Bu teknolojilerin ilk çıkış noktası beşerî hekimlik alanıdır. Ancak, veteriner hekimlik alanında da yaygın olarak kullanılan testler olacağını görülmektedir. Hasta/sürü yanı tanı testleri, uygulayıcının enfekte olma riskini artırması, ikili ya da çoklu enfeksiyonların kültür yöntemine kıyasla gözden kaçması ve kalite kontrol için performans ölçümü gerektirmesi (Reinert, 2007) gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Ancak test teknolojilerinin gelişim süreçleri hala devam etmektedir ve ortaya çıkabilecek her yeni teknolojik gelişmeyle birlikte, test yöntemlerinin sahip olduğu çeşitli kısıtlamaların aşılması veya çok farklı prensiplere dayanan test teknolojilerinin ortaya çıkması söz konusu olabilecektir.

Veteriner hekimlik alanında günümüz şartları değerlendirildiğinde, ilk akla gelen ve en güvenilen teşhis yöntemleri hasta/sürü yanı testleri değildir.

Ancak bu tanı yöntemleri ile ilgili çeşitli kalite standartları belirlendiğinde, analitik performansları ile ilgili daha çok veri elde edildiğinde ve bu verilerin altın standart olarak kabul edilen tanı yöntemleri ile gösterdikleri uyum daha yüksek olduğunda, hekimlerin bu testlere olan güveninin artacağı ifade edilebilir. Hasta/sürü yanı testlerinin geliştirilmesi aşamasında, biyo-mühendis ve veteriner hekimlerin birlikte çalışmaları oldukça önemlidir. Gelecekte hasta/sürü yanı testlerinin tanı alanında çok önem arz edecekleri öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA, 2014: Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (3), 631-646.
- Bahadır EB, Sezginürk MK, 2016: Lateral flow assays; Principles, designs and labels. *Trends Analy Chem*, 82, 286-306.
- Bahadır EB, Sezginürk MK, 2014: A review on impedimetric biosensors. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 44 (1), 248-262.

- Belák S, Ballagi-Pordány A, 1993: Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun*, 17, 55-72.
- Busin V, Wells B, Kersaudy-Kerhoas M, Shu W, Burgess STG, 2016: Opportunities and challenges for the application of microfluidic Technologies in point-of-care veterinary diagnostics. *Mol Cell Probes*, 30, 331-341.
- Chang CC, Chen CC, Wei SC, Lu HH, Liang YH, Lin CW, 2012: Diagnostic Devices for Isothermal Nucleic Acid Amplification. *Sensors*, 12, 8319-8337.
- Chatterjee B, Kalyani N, Das S, Anand A, Sharma TK (2019). Chapter 2- Nano-realm for point-of-care (POC) bacterial diagnostics In: *Methods in Microbiology*, Gurtler V, Ball AS, Soni S (Ed), 19-42, Academic Press, London. Web sayfası: Anonim (1) <https://www.sciencedirect.com>, Erişim tarihi; 11.03.2021.
- Chin CD, Linder V, Sia SK, 2007: Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip*, 7 (1), 41-57.
- Cortina ME, Novak A, Mellini LJ, Elena S, Corbera N, Romero JE, Nicola AM, Ugalde JE, Comerici DJ, Ciocchini AE, 2017: Development of improved enzyme-based and lateral flow immunoassays for rapid and accurate serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol*, 208, 174-180.
- Craw P, Balachandran W, 2012: Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip*, 12, 2469-2486.
- Duarte C, Costa T, Carnerio C, Soares R, Jitariu A, Cardoso S, Piedade M, Bexiga R, Freitas P, 2016: Semi-quantitative method for Streptococci magnetic detection in raw milk. *Biosensors*, 6 (2), 19.
- Etayash H, Jiang K, Thundat T, Kaur K, 2014: Impedimetric Detection of Pathogenic Gram-Positive Bacteria Using an Antimicrobial Peptide from Class IIa Bacteriocins. *Anal Chem*, 86, 1693-1700.
- Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD, Sun Y, 2008: Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal Chim Acta*, 620, 8-26.
- Galvan DD, Yu Q, 2018: Surface-enhanced raman scattering for rapid detection and characterization of antibiotic-resistant bacteria. *Adv Healthcare Mater*, 7, 1701335.
- Hardt S, Schönfeld F, 2007: Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems. Springer, Boston, USA.
- Hiraiwa M, Kim JH, Lee HB, Inoue S, Becker AL, Weigel KM, Cangelosi GA, Lee KH, Chung JH, 2015: Amperometric immunosensor for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. *J Micromech Microeng*, 25, 055013.
- Jacob ME, Crowell MD, Fauls MB, Griffith EH, Ferris KK, 2016: Diagnostic accuracy of rapid immunoassay for point-of-care detection of urinary tract infection in dogs. *Am J Vet Res*, 77 (2), 162-166.
- Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun TR, Viswas KN, Agarwal RK, Manjunathackar HV, Dhama K, 2014: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) test for specific and rapid detection of Brucella abortus in cattle. *Vet Q*, 34 (4), 174-179.
- Kawai K, Inada M, Ito K, Hashimoto K, Nikaido M, Hata E, Katsuda K, KIKU Y, Tagawa Y, Hayashi T, 2017: Detection of bovine mastitis pathogens by loop-mediated isothermal amplification and an electrochemical DNA chip. *J Vet Med Sci*, 79 (12), 1973-1977.
- Kettler H, White K, Hawkes S, 2004: Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. WHO/TDR, Geneva, Switzerland.
- Koczula MK, Gallotta A, 2016: Lateral flow immunoassay. *Essays Biochem*, 60 (1), 111-120.
- Lalande V, Barrault L, Wadel S, Eckert C, Petit JC, Barbut F, 2011: Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Clostridium difficile infections. *J Clin Microbiol*. 49 (7), 2714-2716.
- Lamb LS, Parrish RS, Goran SF, 1995: Current nursing practice of point-of-care laboratory testing in critical care units. *Am J Crit Care*, 4 (6), 429-434.
- Leva-Bueno J, Peyman SA, Millner PA, 2020: A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med Microbiol Immunol*, 209, 343-362.
- Li S, Liu Y, Chen X, Wang M, Hu W, Yan J, 2019: Visual and Rapid Detection of Leptospira interrogans Using Multiple Cross-Displacement Amplification Coupled with Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 19 (8), 604-612.
- Li Y, 2006: Section 2.3. Biosensors In: *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology*. Munack A (Ed), 52-93, American Society of Agricultural Engineers, Michigan. Web sayfası: Anonim (1) <https://cigr.org>, Erişim tarihi; 21.02.2021.
- Loo JFC, Kwok HC, Leung CCH, Wub SY, Lawa ILG, Cheungd YK, Cheunge YY, Chine ML, Kwand P, Huie M, Konga SK, Hob HP, 2016: Sample-to-answer on molecular diagnosis of bacterial infection using integrated lab-on-a-disc. *Biosens and Bioelectron*, 93, 212-219.
- Martinez AW, 2011: Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis*, 3(23), 2589-2592.
- Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM, 2008: Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal Chem*, 80 (10), 3699-3707.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T, 2001: Detection of loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 289 (1), 150-154.
- Mullis KB, Faloona FA, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*. 155, 335-350.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T, 2002: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 16 (3), 223-229.
- Najian ABN, Syafirah EAR, Ismail N, Mohamed M, Yean CY, 2016: Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for

- detection of pathogenic *Leptospira*. *Anal Chim Acta*, 903, 142-148.
- Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh K, Arakawa E, Watabane H, 1992: Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved Polymerase Chain Reaction method. *J Clin Microbiol.* 30 (9), 2484-2486.
- Nayak S, Sridhara A, Melo R, Richer L, Chee NH, Kim J, Vincent L, Steinmiller D, Sia SK, Gomes-Solecki M, 2016: Microfluidics-based point-of-care test for serodiagnosis of Lyme disease. *Sci Rep*, 6 (1), 35069.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watabane K, Amino N, 2000: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28 (12), E63.
- Pal V, Saxena A, Singh S, Goel AK, Kumar JS, Parida MM, 2018: Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Burkholderia mallei*. *Transbound Emerg Dis.* 65, e32-e39.
- Patterson AS, Heithoff DM, Ferguson BS, Soh HT, Mahan MJ, Plaxcoa KW, 2013: Microfluidic chip-based detection and intraspecies strain discrimination of *Salmonella* serovars derived from whole blood of septic mice. *Appl Environ Microbiol*, 79 (7), 2302-2311.
- Raele DA, Garofolo G, Galante D, Cafiero MA, 2015: Molecular detection of *Coxiella burnetii* using an alternative loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP). *Vet Ital*, 51 (1), 73-78.
- Rattle S, Hofmann O, Price CP, Kricka LJ, Wild D (2013). Lab-on-a-chip, micro- and nanoscale immunoassay systems and microarrays In: *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, Wild D (Ed), 175-202, Elsevier, Oxford. Web sayfası: Anonim (1) <https://www.sciencedirect.com>, Erişim tarihi; 06.03.2021.
- Reinert RR, 2007: Rapid streptococcal antigen detection tests. *J Lab Med.* 31 (6),280-293.
- Sadeghi SJ, 2013: Amperometric biosensors In: *Encyclopedia of Biophysics*, Roberts GCK (Ed), 61-67, Springer, Berlin. Web sayfası: Anonim (1) <https://link.springer.com>, Erişim tarihi; 25.02.2021.
- Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D, 2016a: Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*, 9 (5), 465-469.
- Sahoo PR, Mishra SR, Kar D, 2016b: Lateral flow assay-A new platform for diagnosis of livestock disease. *Int J Livest Res*, 6 (2), 1-9.
- Salam F, Uludag Y, Tothill IE, 2013: Real-time and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. *Talanta*, 115, 761-767.
- Salman A, Carney H, Bateson S, Ali Z, 2020: Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection. *Talanta*, 207, 120303.
- Sareyyupoglu B, Akan M, 2006 Restriction fragment length polymorphism typing of infectious bursal disease virüs field strains in Turkey. *Avian Dis*, 50, 545-549.
- Sia SK, Whitesides GM, 2003: Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24 (21), 3563-3576.
- Taheri RA, Rezayan AH, Rahimi F, Mohammadnejad J, Kamali M, 2016: Development of an immunosensor using oriented immobilized antiOmpW for sensitive detection of *Vibrio cholerae* by surface plasmon resonance. *Biosens and Bioelectron*, 86, 484-488.
- Wadhwa A, Foote RS, Shaw RW, Eda S, 2012: Bead-based microfluidic immunoassay for diagnosis of John's disease. *J Immunol Methods*, 382 (1-2), 196-202.
- Wang Y, Wang Y, Ma AJ, Li DX, Luo LJ, Liu DX, Jing D, Liu K, Ye CY, 2015: Rapid and sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by multiple cross displacement amplification. *Sci Rep*, 5, 11902.
- Wang Y, Li H, Wang Y, Zhang L, Xu J, Ye C, 2017: Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*, 8, 192.
- Wang C, Gu B, Liu Q, Pang Y, Xiao R, Wang S, 2018: Combined use of vancomycin-modified Ag-coated magnetic nanoparticles and secondary enhanced nanoparticles for rapid surface-enhanced Raman scattering detection of bacteria. *Int J Nanomedicine*, 13, 1159-1178.
- Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N, 2021: Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*, 37, 101092.
- Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Nukina M, Misawa N, Inoue K, 2009: Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Campylobacter fetus*. *Vet Microbiol.* 136, 393-396.
- Zhang X, Lowe SB, Gooding JJ, 2014: Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens and Bioelectron*, 61, 491-499.
- Zelada-Guillén GA, Bhosale SV, Riu J, Rius FX, 2010: Real-Time Potentiometric Detection of Bacteria in Complex Samples. *Anal Chem*, 82, 9254-9260.

*Yazışma Adresi: Bengi AKKOYUNLU

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

e-mail: bengi_trkr@hotmail.com

HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI *

1- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Harran Üniv Vet Fak Derg), özellikle Veteriner Hekimliği bilim alanı ile ilgili olmak üzere insan ve hayvan sağlığını kapsayan Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanmış orijinal klinik ve deneysel araştırmalar, olgu sunumları, derlemeler (çağrılı veya sorumlu yazara ait derleme konusu ile ilgili en az 3 araştırma makalesinin referans listesinde olması gereklidir), kısa bilimsel makale ve editöre mektuplar yayınlayan hakemli bir dergidir. Dergide İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir. Dergi 6 ayda bir, yılda 2 sayı olarak yayınlanır. Yayınlanan makalelerden ücret alınmamaktadır.

2- Dergiye kabul edilen yayınlar başka bir yerde yayınlanmamış olmalıdır. Eş zamanlı olarak incelenmek üzere başka dergilere gönderilmiş olmamalıdır. Yayınlanan makalelerden doğacak her türlü hukuki ve cezai sorumluluk yazarlara aittir. Yazarlara yayın hakkı bedeli ödenmez. Gönderilen makaleler ve ekleri makale yayınlansın veya yayınlanmasın geri iade edilmez.

3- Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir. Bununla birlikte yayın, tezden üretilmiş ise ve destekleyen kuruluş var ise yayında belirtilmelidir.

4- Dergi Editörlüğüne ulaşan makale, dergi editörlüğüne ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

5- Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makale kabul sürecinde, iki hakemin görüşlerinin farklı olması durumunda editör, üçüncü bir hakemin veya danışma kurulunun görüşünü alarak karar verir.

6- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, etik ilkelere saygı çerçevesinde, TÜBİTAK ULAKBİM tarafından Türkiye'de tüm üniversitelerin kullanımına açmış olduğu "ithenticate" intihal tespit programı aracılığıyla gönderilen tüm makale, olgu sunumu ve derlemelerin ön değerlendirmesinin yapılması ve sonuçların gönderilmesi gerekmektedir. Bu ön değerlendirme sonuçlarına göre, makale, olgu sunumu veya derlemelerin başka kaynaklarla benzerlik oranının **%15'i** (özet, abstract ve kaynaklar hariç) aşmaması gerekmektedir. "ithenticate" programı aracılığı ile yapılacak öndeğerlendirmede benzerlik oranının %15 değerini aşması durumunda yayımlanmak üzere dergimize gönderilen makale, olgu sunumu veya derlemeler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

7- Gönderilen herhangi bir makalenin (tüm makale kategorileri için) referanslarının en az % 20'sinin son beş yılda yayınlanan referansları içermesi gerekir. Anonim kaynaklar asgari düzeyde tutulmalıdır.

8- Makale yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan Telif Hakkı Devir Sözleşmesinin tüm yazarlar tarafından imzalanarak basımdan önce elektronik olarak dergi editörlüğüne gönderilmesi gerekmektedir. Telif Hakkı Devir Sözleşmesi gönderilmeyen makaleler yayımlamaya kabul edilmiş olsalar bile basılmazlar.

9- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar, <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd> adresinden gönderildiğinde değerlendirme sürecine alınmaktadır.

10- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar MS Word formatında, tüm fotoğraflar (resimler) en az 300 dpi çözünürlükte, TIFF veya JPEG formatında kaydedilmiş olmalıdır.

YAZIM KURALLARI

Yazılar, MS Word formatında, Times New Roman yazı tipinde, 12 punto, çift satır aralıklı ve her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak hazırlanmalıdır. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) eklenmelidir. Bu şekildeki yazılar, şekil ve tablolar dâhil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalar ve derlemelerde 15, kısa bilimsel makale ve olgu sunumlarında 5 sayfayı geçmemelidir.

Birimler ve ölçüler için Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır.

Araştırma Makaleleri: Orijinal araştırma makaleleri aşağıdaki ana konu sıralamasına göre dizilmelidir: Başlık, Yazar adları (Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli), Yazar adresleri, Yazar ORCID numaraları, Özet ve Anahtar kelimeler (3 - 6 kelime), İngilizce başlık, Abstract ve Keywords ile Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür veya Bilgilendirme ile Kaynaklar. Her bir Tablo ve Şekil ayrı sayfalarda yer almalıdır.

YAZIM DÜZENİ

Özet: Orijinal araştırma makalelerinde 250, diğer makale türlerinde 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: En fazla 6 tane olmak üzere her iki dildeki özeti altında alfabetik sırayla verilmelidir. Anahtar kelimeler, Türkiye Bilim Terimleri arasından seçilmelidir. Anahtar kelimelerin seçiminde Türkiye Bilim Terimleri internet adresinden (<http://www.bilimterimleri.com>) yararlanılmalıdır.

Giriş: Sonuçların anlaşılabilirliği ve yorumlanabilirliği için o konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar hakkında bilgilere yer verilmelidir. Giriş'te çalışmanın hipotezi belirtilmelidir. Çalışmanın amacı bu bölümün en sonunda açık olarak yazılmalıdır.

Materyal ve Metot: Bu bölümde deneysel çalışmalar diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanabilecek yeterlilikteki detayı ile verilmelidir. Uluslararası indeksli dergilerde yayınlanmış bir makalede açıklanan bir teknik kullanıldığında, metodun çok kısa açıklanması ve ilgili orijinal makaleye atıf yapılması gereklidir. Makalede etik kurul izni ve/veya yasal/özel izin alınmasının gerekip gerekmediği bu bölümde belirtilmelidir. Materyal olarak hayvan kullanılan orijinal araştırma makalelerinde (klinik, deneysel, saha çalışmaları vb.); etik kurul onayı alınmış olmalıdır. Etik kurul onay/izin belgesinin "alındığı etik kurulun ismini, sayısını ve tarihini" içeren açıklayıcı bilgiler materyal ve metot bölümüne yazılmalıdır. Yayın kurulu etik kurul onay belgesini isteme hakkına sahiptir.

Bulgular: Araştırma bulguları açık ve anlaşılabilir şekilde verilmelidir. Bulgular, gerektiğinde tablo ve şekillerle desteklenmeli ve kısa olarak sunulmalıdır.

Tartışma ve Sonuç: Bulgular gereksiz ayrıntıya girmeden literatürler ışığında tartışılmalı ve bulguların önemi vurgulanmalıdır. Sonuç ya da öneri cümlesi ile bitirilmelidir.

Teşekkür: Çalışma veya makaleye kişisel katkı ve parasal destek burada belirtilmelidir.

Derleme: Derginin yayın alanlarındaki konularda yenilikleri içeren, güncel kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmış makaleler olup, yazarların konu ile doğrudan ilişkili en az 3 adet çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır). Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde değerlendirmeye alınan ve yayınlanan derlemeler **çağrılı derlemelerden** oluşmaktadır. Derlemelerde; Özet, Giriş, Sonuç ve Kaynaklar bölümleri bulunmalıdır.

Olgu Sunumu: Yazarların, karşılaştıkları yeni veya ender gözlemlenen olguların ele alındığı, bilimsel değere sahip bilgileri içeren eserlerdir. En fazla 15 kaynak kullanılmalı ve bu kaynakların güncel olmasına özen gösterilmelidir. Olgu sunumları; Özet, Giriş, Olgu tanımı, Tartışma ve Sonuç ile Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır.

Kısa Bilimsel Makale: Kısa bilimsel makalelerde dar kapsamlı olarak ele alınmış, yeni bilgi ve bulgular sunulmalıdır. Araştırma makalesi formatında hazırlanmalı ve en fazla 5 sayfa olmalıdır. En fazla 2 tablo veya şekil içermelidir.

Kaynaklar

Metin içinde atıf yapılırken;

1. Yazar veya yazarların soyadından sonra parantez içinde kaynağın yayın yılı belirtilmelidir; Adams (1998) tarafından; Wilkie ve Whittaker (1997) tarafından; Doyle ve ark. (2007) tarafından....
2. Cümlelerin sonunda atıf yapıldığında ise yazar ismi ve yayın yılı parantez içinde belirtilmelidir; ... bildirilmiştir (Adams, 1998); bildirilmiştir (Wilkie ve Whittaker, 1997); bildirilmiştir (Doyle ve ark., 2007).
3. Birden çok kaynağa atıf yapılması durumunda önce alfabetik sonra kronolojik sıralama yapılmalıdır; bildirilmiştir (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle ve ark., 2007; Wilkie ve Whittaker, 2006).
4. Aynı yazarın aynı yıl yayınları söz konusu ise her biri "a" harfinden başlayarak küçük harflerle işaretlenmelidir; (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

Kaynak listesi aşağıdaki şekilde hazırlanmalıdır:

1. **Kaynak listesi yazar soyadına göre alfabetik olarak sıralanmalıdır.**
2. **Kaynaklarda yer alacak dergi adları ISI web of Science'a göre kısaltılmalı ve italik yazılmalıdır.**
3. **Kaynakların yazın şekli aşağıdaki şekilde olmalıdır.**

Makale; Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

Kitap; Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Kitaptan bir bölüm: Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. **Web sayfası:** Anonim (1) <http://www.emea.europa.eu>, Erişim tarihi; 01.04.2010.

Tez: Er A, 2009: Makrolid grubu antibiyotiklerin endotoksemide sitokin düzeylerine etkisi. Doktora tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Bilimsel toplantıda sunulan bildiri: Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

Tablo ve Şekiller: Her bir tablo ve şekil ayrı sayfalara yerleştirilmelidir. Kullanım sırasına göre numaralandırılmalı, kısa başlıklarla ifade edilmeli ve metin içinde tablo numarası verilerek atıfta bulunulmalıdır. Tablo başlıkları makalenin yazım dilinde tablonun üst bölümüne yazılmalıdır. Tabloda kullanılan kısaltmalar ve gerekli açıklamalar tablo altında verilmelidir. Şekil başlıkları makalenin yazım dilinde şeklin alt bölümüne yazılmalıdır.

HARRAN UNIVERSITY VETERINARY FACULTY JOURNAL PUBLICATION RULES *

- 1- Journal of Harran University Veterinary Faculty is a refereed journal that publishes original clinical and experimental research in Turkish and English, covering human and animal health, especially in the field of Veterinary Science, case reports, reviews (at least 3 on the subject of compilation of the invited or responsible author) the research paper must be on the reference list), short scientific articles and letters to the editor. Publishing articles in English is given priority in the journal. The journal is published electronically every 6 months and 2 issues a year. There are no fees for published articles.
- 2- Publications accepted to the journal should not have been published elsewhere. It should not have been submitted to other journals for review simultaneously. All legal and criminal liability arising from the published articles belong to the authors. Authors are not paid the right to publish. Submitted articles and their attachments are not returned, whether the article is published or not.
- 3- The works that have been previously communicated in congresses and published with a summary are accepted to be stated on the cover page. However, if the publication is produced from the thesis and there is a supporting organization, it should be stated in the publication.
- 4- The article that reaches the Journal Editor is subjected to preliminary evaluation by the journal editor. Editing has the right to reject the article according to the preliminary evaluation result or to request correction before subjection to the reviewer.
- 5- Articles are sent to at least two referees for evaluation. In the article acceptance process, if the opinions of the two referees differ, the editor decides by taking the opinion of a third referee or advisory board.
- 6- TUBITAK ULAKBIM respect for ethical principles, which opened to the use of all universities in Turkey "iThenticate" sent through plagiarism detection program, the whole article, must be made of the case report and review of the preliminary assessment and the delivery of results. According to these preliminary evaluation results, the similarity rate of articles, case reports or reviews with other references should not exceed 15% (excluding abstract, abstract and references). Articles, case reports or reviews sent to our journal for publication will not be evaluated if the similarity rate exceeds 15% in the evaluation made through the "ithenticate" program.
- 7- At least 20% of references to any submitted article (for all article categories) must include references published in the last five years. Anonymous references should be kept to a minimum.
- 8- If the article is accepted for publication, the Copyright Transfer Agreement, which includes the declaration that any right of publication has been transferred, must be signed by all authors and sent to the journal editor before printing. Articles without Copyright Transfer Agreement are not published even if they are accepted to publish.
- 9- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. When the works are sent to <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>, they are taken into the evaluation process.
- 10- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. Works must be saved in MS Word format, all photographs (pictures) at least 300 dpi resolution, in TIFF or JPEG format.

WRITING RULES

Manuscripts should be prepared in MS Word format, Times New Roman font, with 12 font size, double line spacing and 2.5 cm space on each side. Line numbers (continually starting from page 2 of the article) should be added to the article. Articles of this type should not exceed 15 pages in original scientific research and reviews, including figures and tables, and 5 pages in short scientific articles and case reports.

International Standard Units (SI-system) should be used for units and dimensions.

Research Articles: Original research articles should be arranged in the order of the following main topics: Title, Author names (must be marked with the responsible author (*)), Author addresses, Author ORCID numbers, Abstract and Keywords (3 - 6 words), English title, Abstract and Introduction to Keywords, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, Thanks or Information and References. Each Table and Figure should be on separate pages.

STYLE AND FORMAT

Abstract: It should be prepared not to exceed 250 words in original research articles and 200 words in other types of articles.

Keywords: It should be given in alphabetical order below the summary in both languages, maximum 6. Keywords should be selected from Turkey Science Terms. Turkey Science Terms in the selection of keywords from the internet address (<http://www.bilimterimleri.com>) should be utilized.

Introduction: In order for the results to be understood and interpreted, information about the studies done on that subject should be included. In the introduction, the hypothesis of the study should be specified. The purpose of the study should be clearly written at the end of this section.

Material and Method: Experimental studies should be given in this section with sufficient detail that can be repeated by other researchers. When using a technique described in an article published in international indexed journals, it is necessary to describe the method very briefly and to cite the relevant original article. In the article, it should be stated in this section whether the ethical committee permission and / or legal / special permission should be obtained. In original research articles using animals as materials (clinical, experimental, field studies, etc.); ethics committee approval must have been obtained. Explanatory information including the name, number and date of the ethics committee's ethics committee approval / permit document should be written in the material and method section. The editorial board has the right to request the ethics committee approval document.

Results: Research findings should be given clearly and understandably. Findings should be supported with tables and figures when necessary and presented briefly.

Discussion and Conclusion: Findings should be discussed in the light of the literature before going into unnecessary detail and the importance of the findings should be emphasized. It should be finished with a conclusion or suggestion sentence.

Acknowledgment: Personal contribution and monetary support to the study or article should be stated here.

Compilation: These are articles that contain innovations on the subjects of the journal's publications and are prepared by using current references. If the authors have at least 3 works directly related to the subject and they can be accepted for publication. When submitting his review, the responsible author should send the imprint information of the articles related to the subject to the editor of the journal (article tags must be presented on the last page of the article text). Reviews compiled and published in Harran University Veterinary Faculty Journal are invited reviews. In the compilation; Summary, Introduction, Conclusion and References sections should be available.

Case Report: These are the works that contain information of scientific value that the authors discuss the new or rare cases that they encounter. Maximum 15 references should be used and care should be taken to keep these references up to date. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

Short Scientific Article: In short scientific articles, it should be handled narrowly and new information and findings should be presented. It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. Must contain no more than 2 tables or figures.

References:

While citing in the text;

1. The publication year of the reference should be specified in parentheses after the surname of the author or authors; By Adams (1998); By Wilkie and Whittaker (1997); Doyle et al. (2007) by....

2. When cited at the end of the sentence, the name of the author and the year of publication must be indicated in parentheses; ... have been reported (Adams, 1998); has been reported (Wilkie and Whittaker, 1997); has been reported (Doyle et al., 2007).

3. In case of reference to more than one reference, first alphabetical and chronological order should be done;

.... reported (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle et al., 2007; Wilkie & Whittaker, 2006).

4. If the same author has publications in the same year, each should be marked in lowercase letters, starting with the letter "a";

.... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

The list of references should be prepared as follows:

1. Reference list should be listed alphabetically by author surname.

2. The names of the journals in the references should be shortened according to the ISI web of Science and should be written in italics.

3. Type of references should be as follows.

Journal article; Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

Book; Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Chapter in a book: Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. Web page: Anonymous (1) <http://www.emea.europa.eu>, Access date; 01.04.2010.

Thesis: Er A, 2009: Effect of macrolide antibiotics on cytokine levels in endotoxemia. PhD thesis, SU Health Sciences Institute, Konya.

Paper presented at the scientific meeting: Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

Tables and Figures: Each table and figure should be placed on separate pages. 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 and necessary explanations used in the table should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

TELİF HAKKI DEVİR FORMU

Harran Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğüne

Biz aşağıda adı, soyadı ve imzaları bulunan yazarlar, tarafımızdan yazılmış,

.....
.....

İsimli makalenin içeriği, sonuçları ve yorumları konusunda, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımadığını kabul ederiz. Sunduğumuz makalenin orijinal olduğunu, herhangi bir başka dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini, daha önce yayınlanmadığını beyan ederiz. Makalenin telif hakkından feragat etmeyi kabul ederek sorumluluğu üstlenir ve imza ederiz. Makalenin telif hakkı Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne devredilerek yayınlanması konusunda yetkili kılınmıştır.

Bununla birlikte yazarların aşağıdaki hakları saklıdır:

1. Telif Hakkı dışında kalan patent v.b. bütün tescil edilmiş haklar.
2. Yazarın gelecekteki kitaplar ve dersler gibi çalışmalarında; makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı.
3. Makaleyi ticari amaçlarla kullanmamak koşulu ile çoğaltma hakkı.

Yazarın Adı ve Soyadı

Tarih

İmza

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

Sorumlu yazarın adı/yazışma adresi:

.....

Telefon: Fax: E-mail:

(Makale başvurusu ile bu formu bütün yazarlar tarafından imzalanmış olarak "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" adresinden yükleviniz.)

COPYRIGHT TRANSFER FORM

We grant that Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has no responsibility for the content, results and conclusions of the manuscript entitled,

.....
.....

We state that the submitted manuscript is original, has not been published or is not being considered for publishing elsewhere. We grant to disclaim the copyright and sign this form by undertaking all responsibility. Hereby Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has been authorized for publishing by transferring the copyright of the manuscript.

However the following rights of the author(s) are reserved:

1. All other rights such as patent right.
2. The rights for using the manuscript as a whole or a part in their future Works such as books or lectures without paying any charge.
3. The rights for reproducing the manuscript for purpose other than commercial use.

<u>Name and Surname of the Author</u>	<u>Date</u>	<u>Signature</u>
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Address of the Corresponding Author:

.....
.....

Phone: Fax: E-mail:

(Upload the form to "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" after filling it.)

