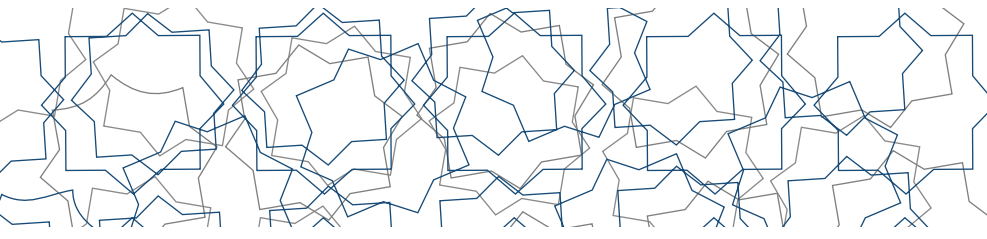


# JRVN

## Journal of Research in Veterinary Medicine

Year: 2020 Volume: 39 Issue: 1  
e- ISSN: 2667-6745





Bursa Uludag Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına Sahibi:

**Prof. Dr. Hüseyin YILDIZ**  
Dekan

**Editörler**  
(Editors)

Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ  
Doç. Dr. Murat CENGİZ  
Doç. Dr. İlker ARICAN

**İstatistik Editörü**  
(Statistics Editor)

Doç. Dr. Ender ÇARKUNGÖZ

**Baskı ve Mizanpaj Editörü**  
(Layout Editor)

Doç. Dr. İlker ARICAN  
Doç. Sezin TÜRK KAYA

**Yazışma Adresi**  
(Address for Correspondence)

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, TR-16240 Görükle Kampüsü,  
Bursa, Turkey

**Tel :** + 90 224 294 12 07 - 294 12 08

**Faks :** + 90 224 294 12 02

**E.posta :** vetdergi@uludag.edu.tr

**URL :** <http://veteriner.uludag.edu.tr>

<https://dergipark.org.tr/jrvm>

**Kapak ve Sayfa Tasarımı / Cover and Page Design**

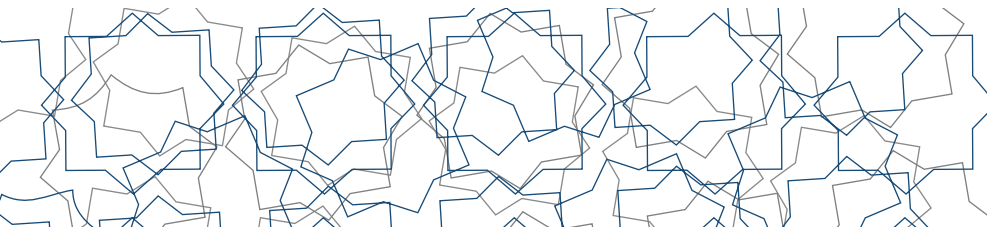
Doç. Sezin TÜRK KAYA

**Tasarım Uygulama / Design Application**

Doç. Dr. İlker ARICAN

© Bursa Uludag Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi  
Tüm hakları saklı olup, bu derginin tamamı ya da dergide yer alan bilimsel çalışmaların  
bir kısmı ya da tamamı 5846 sayılı yasanın hükümlerine göre Bursa Uludağ Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi Dekanlığının yazılı izni olmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi  
ya da herhangi bir kayıt sistemi ile çoğaltılamaz, yayımlanamaz.

TR Dizin, CABI Abstract, COSMOS IF, EBSCOhost, OpenAIRE, ResearchBib,  
Sindex, Google Scholar ve Türkiye Atıf Dizini tarafından  
taranmaktadır.



**Editör ve Tavsiye Kurulu  
(Editor and Advisory Board)**

Ahmet AKKOÇ, Assoc. Prof.,  
Bursa Uludag Üniversitesi, Türkiye (Baş Editör)

Murat CENGİZ, Assoc. Prof.,  
Bursa Uludag Üniversitesi, Türkiye (Editör)

İlker ARICAN, Assoc. Prof.,  
Bursa Uludag Üniversitesi, Türkiye (Editör)

Sezin TÜRK KAYA, Assoc. Prof.,  
Bursa Uludag Üniversitesi, Türkiye (Mizanpaj  
Editörü)

Ender ÇARKUNGÖZ, Dr.,  
Bursa Uludag Üniversitesi, Türkiye (İstatistik  
Editörü)

Petra CAGNARDI, Assoc. Prof.,  
The University of Milan, Milan, İtalya

Tulay BAKIREL, Prof. Dr.,  
İstanbul Üniversitesi, Türkiye

Aydın KETANI, Prof. Dr.,  
Dicle Üniversitesi, Türkiye

Silvia Prezioso, Assoc. Prof.,  
University of Camerino, İtalya

Manish Neupane, Assoc. Prof.,  
Thomas Jefferson University, ABD

Georgios Delis, Dr.,  
Aristotle University of  
Thessaloniki, Yunanistan

Gonçalo da Graça Pereira, Dr.,  
CECA-ICET Universidade do  
Porto, Portekiz

Sokol Duro, Assoc. Prof.,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Agricultural University of Tirana

Sibel Gür, Afyon Kocatepe  
University, Department of  
Virology, Turkey

Zlatko Janječić, Prof. Dr. University  
of Zagreb Faculty of Agriculture,  
Crotia

## YAZIM KURALLARI

- 1 Makale İngilizce veya Türkçe olarak yazılabilir.
- 2 Tüm makalede, her sayfada bireysel satır numarası, normal kenar boşluğu ve çift aralık kullanılmalıdır. Bu kurallar Özet, Dipnot ve Kaynaklar bölümlerinde de uygulanmalıdır. Makalenin Kaynaklar ve Tablolar dahil her sayfası numaralandırılmalıdır.
- 3 Tüm makale tipleri Microsoft Word (2007 ve sonrası versiyonlar) Times New Roman karakteri ve 12 punto ile yazılmalıdır.
- 4 Makalenin genel organizasyonu şu şekilde olmalıdır: Başlık (açık, tanımlayıcı, kısa olmalıdır); Yazar(lar)ın ad(lar)ı; İşyeri açık posta adres (ler)i; Sorumlu yazarın telefon numarası, faks numarası ve e-posta adresi; Özet, Anahtar kelimeler (3 – 6 kelime), Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablolar (her biri ayrı sayfada), Şekiller (her biri ayrı sayfada)
- 5 Başlık ve altbaşlıklar, ayrı bir satırda koyu olarak ve paragraf girişini olmadan yazılmalıdır.
- 6 SI birimleri ve standart kısaltmalar kullanılmalıdır.

### Başlık Sayfası

Başlık; Yazar(lar)ın ad(lar)ı; İşyeri açık posta adres (ler)i; Sorumlu yazarın telefon numarası, faks numarası ve e-posta adresi.

### Ana Metin

Özet:Özet 300 kelimeyi aşmamalıdır ve kaynak kullanımından kaçınılmalıdır. Türkçe sunulan makalelerde ayrıca İngilizce Özet (Abstract) bölümü hazırlanmalıdır.

Giriş:Bu bölümde sonuçların anlaşılabilirliği ve yorumlanabilirliği için o konu ile ilgili (daha önceden) yapılmış olan çalışmalar hakkında bilgilere yer verilmelidir. Girişte çalışmanın hipotezi belirtilmelidir. Çalışmanın amacı bu bölümün en sonunda açık olarak yazılmalıdır. Sadece gerekli olan kaynaklara atıf ya-

pılmalıdır.

Materyal ve Metot: Bu bölümde deneysel çalışmalar diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanabilecek yeterlilikteki detayı ile verilmelidir. İstatistik çalışmalar ayrı bir alt başlık şeklinde sunulabilir. Uluslararası indekslerde yer alan dergilerde yayınlanmış bir makalede açıklanan bir teknik yeniden kullanıldığında, metodun çok kısa açıklanması ve ilgili orijinal makaleye atıf yapılması yeterlidir. Hayvan deneylerini içeren çalışmalarda yerel etik kurul kararlarına uyulmalıdır.

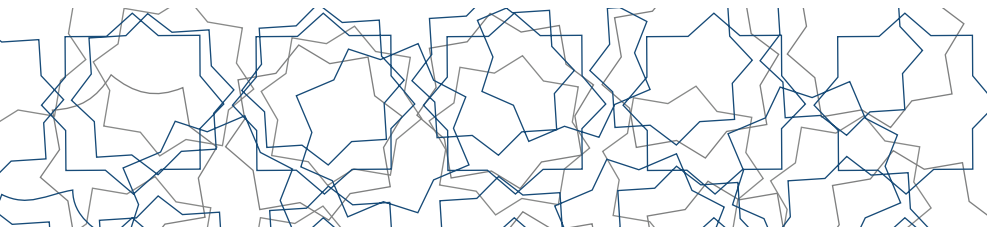
Sonuçlar:Araştırma bulguları açık ve anlaşılabilir şekilde, Materyal ve Metot bölümünde verilen sıra ile sunulmalı, tartışma veya yorumlara yer verilmemelidir. Bulgular tablo ve şekillerle desteklenerek kısa olarak sunulmalıdır.

Tartışma ve Sonuç: Bulgular gereksiz ayrıntıya girmeden tartışılmalı, bulguların önemi ve literatür içindeki yeri vurgulanmalıdır. Teşekkür:Parasal destek, çalışmalara veya makaleye kişisel katkıları burada belirtilmelidir.

### Kaynaklar

- 1 Makalede atıf yapılan tüm kaynaklar makale sonunda bir Kaynaklar Listesi halinde verilmelidir. Kaynak listesinde yer alan tüm kaynaklara da makale içinde atıf yapılmış olmasına dikkat edilmelidir.
- 2 JRVM American Medical Association kaynak yazma stili benimsenmiştir. EndNote® kullanıcıları JRVM için yayın hazırlarken JAMA (Journal of American Medical Association) kaynak yazım stili seçmelidir.
- 3 Metin içinde, tablolarda veya şekillerde kaynak numaraları verilmelidir. 2 veya daha fazla kaynağın sitasyonunda birinci ile sonuncu kaynak numaralarının arasına tire konulmalıdır (Örneğin: Sitasyon1-4). Çoklu sitasyonlarda sitasyonları birbirinden ayırmak için boşluksuz olarak virgül kullanılmalıdır (Örneğin: Sitasyon1,2,4)
- 4 Kaynak Listesi: Kaynak listesi metin içindeki sitasyon sırasına göre numaralandırılmalıdır.





*Kaynakların yazılmasında aşağıdaki format uygulanmalıdır:*

Dergiden Alınmış Bir Makale: Rainer S, Thomas D, Tokarz D, et al. Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. Arch Neurol. 2004;61(7):1025-1029.

Kitap: Adkinson N, Yunginger J, Busse W, Bochner B, Holgate S, Middleton E, eds. Middleton's Allergy: Principles and Practice. 6th ed. St Louis, MO: Mosby; 2003.

Kitap Bölümü: Solensky R. Drug allergy: desensitization and treatment of reactions to antibiotics and aspirin. In: Lockey P, ed. Allergens and Allergen Immunotherapy. 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker; 2004:585-606.

Yayına kabul edilmiş ama basılmamış çalışmalar referanslarda "(basımda)" olarak belirtilmelidir. Carrau RL, Khidr A, Crawley JA, Hillson EM, Davis JK, Pashos CL. The impact of laryngopharyngeal reflux on patient-reported quality of life. Laryngoscope. In press.

Web kaynaklarına atıf yapıldığında URL adresi tam olarak verilmelidir. Sayfaya erişim tarihi ve varsa yazar adı belirtilmelidir. Antimicrobial Resistance. Infectious Diseases Society of America. [http://www.idsociety.org/Topic\\_Antimicrobial\\_Resistanc\\_e/](http://www.idsociety.org/Topic_Antimicrobial_Resistanc_e/). Accessed July 21, 2014.

Sayı ve sayfa numarası belli olmayan ancak online erişime açık olan yayınlar Digital Object Identifier (DOI) kodları ile belirtilmelidir. Smeeth L, Iliffe S. Community screening for visual impairment in the elderly. Cochrane Database Syst Rev. 2002;(2):CD001054. doi:10.1002/14651858.CD1001054.

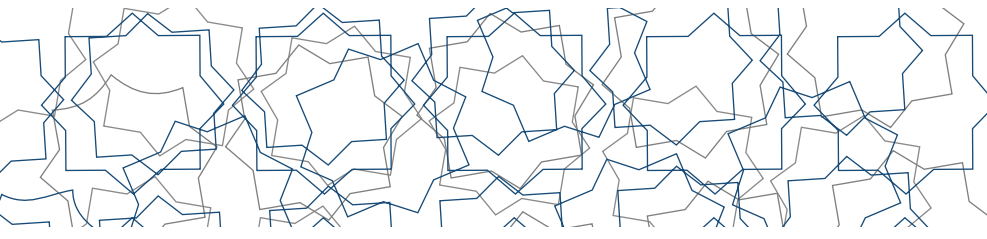
5) Kaynaklar listesinde yer alan dergilerin kısa adları International The National Library of Medicine'a (NLM, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

**Tablolar**

- 1 Geniş tablolar kullanılmamalı, zorunlu durumlarda kolonlar ile satırların yerleri değiştirilerek tablo daraltılmalıdır.
- 2 Birkaç tür veri aynı tabloda verilemiyorsa her biri farklı tablolarda ve anlaşılır şekilde verilmelidir.
- 3 Tüm tablolar metindeki sıralamasına göre ana metinden sonra ayrı birer sayfada sunulmalıdır. Ayrıca tabloların gireceği yerler metin içerisinde belirtilmelidir. Metin içinde tüm tablolara atıf yapılmış olmalıdır.
- 4 Her tabloya makale dilinde kısa ve açıklayıcı başlık konulmalıdır.
- 5 Tablo sütun başlıkları kısa ve anlamlı olmalıdır. Parantez içinde standart kısaltmalar ve ölçüm birimleri kullanılmalıdır.
- 6 Sütun ve satırları bölmek için dikey ya da yatay çizgiler kullanılmamalıdır.
- 7) Tablo altına sadece tablo bilgilerini anlamayı kolaylaştıracak önemli açıklamaları içeren makale dilinde dip not konulabilir.
- 8 Tabloda başka bir makaleye ait bulgular kullanılacaksa, alıntı yapılan kaynak tablo altında dipnot olarak belirtilmeli ve kaynaklar listesinde de gösterilmelidir.

**Şekiller**

- 1 Tüm şekil ve resimler metindeki sıralamasına göre ana metinden sonra ayrı birer sayfada sunulmalıdır. Şekil ve resim ile ilgili bilgi makale içinde yazılmalı ve şekile / resime yazı içinde numarası ile atıf yapılmalıdır.
- 2 Her şekil ve resmin makale dilinde başlığı olmalıdır.
- 3 Şekil ile ilgili açıklama şeklin altında ve makale dilinde verilmelidir.



## AUTHOR GUIDELINES

- 1 Manuscripts should be written in English or Turkish.
- 2 Manuscripts should have (numbered lines) with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including references, tables, etc. should be numbered.
- 3 All type of manuscripts should be written in Microsoft Word (2007 and newer versions) using Times New Roman characters in 12 pnt.
- 4 Manuscripts in general should be organized in the following order: Title (should be clear, descriptive and not too long); Name(s) of author(s); Complete postal address (es) of affiliations; Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author; Abstract, Keywords (3 – 6 phrases), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables (separate pages each) Figures (separate pages each).
- 5 Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed bold on a separate line, without indentation.
- 6 SI units and standard abbreviations should be used.

### Title Page

Title (should be clear, descriptive and not too long); Name(s) of author(s); Complete postal address (es) of affiliations; Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author.

### Main Text

**Abstract:** Manuscripts of original research papers should include an Abstract of 300 or fewer words. References should not be cited in this section.

**Introduction:** This section should supply pertinent background information to for understanding and interpretation of the results. It must identify hypothesis and purpose of the study. The

aim of the study should be clearly given at the end of this section. Only essential references should be cited.

**Materials and Methods:** This section should describe the experimental procedures in sufficient detail to allow other scientists to repeat the experiments. Statistical methods can be given in a separate subtitle. Where techniques that have already been described in an indexed journal are used, this section should be concise and provide relevant references, only.

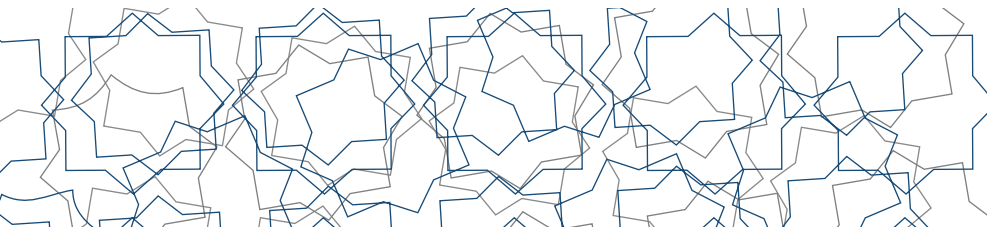
**Results:** The Results section should provide data that are clearly and simply stated. This section should be arranged in the order as in the section of Methods and not include discussion or conclusions. The results should be presented concisely, including tables or figures.

**Discussion and Conclusion:** The discussion should focus on the subject/findings and should be brief, containing only discussion that is necessary for the interpretation of data.

**Acknowledgements:** Any additional information concerning funding and personal contributions to the work or manuscripts should be noted.

### References

- 1 All publications cited in the text should be presented in a list of references (and vice-versa) following the text of the manuscript.
- 2 JRVM follow the style adopted by American Medical Association. Users EndNote® software should select JAMA reference style when preparing references for JRVM.
- 3 Number references consecutively with superscript Arabic numerals, including text, tables, or figures. For 2 or more references cited at a given place, use hyphens to join the first and last numbers of a closed series (Example: Citation<sup>1-4</sup>). Use commas without a space to separate other parts of a multiple citation (Example: Citation<sup>1,2,4</sup>)
- 4 Reference list: List items numerically (eg. 1, 2, 3, 4) in the order they are cited in the text.



*Use the following system for arranging your reference list:*

For periodicals: Rainer S, Thomas D, Tokarz D, et al. Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. *Arch Neurol.* 2004;61(7):1025-1029.

For books: Adkinson N, Yunginger J, Busse W, Bochner B, Holgate S, Middleton E, eds. *Middleton's Allergy: Principles and Practice.* 6th ed. St Louis, MO: Mosby; 2003.

For book chapters: Solensky R. Drug allergy: desensitization and treatment of reactions to antibiotics and aspirin. In: Lockey P, ed. *Allergens and Allergen Immunotherapy.* 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker; 2004:585-606.

Works accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". Carrau RL, Khidr A, Crawley JA, Hillson EM, Davis JK, Pashos CL. The impact of laryngopharyngeal reflux on patient-reported quality of life. *Laryngoscope.* In press. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates of arrival etc. should also be given. Antimicrobial Resistance. Infectious Diseases Society of America. [http://www.idsociety.org/Topic\\_Antimicrobial\\_Resistance/](http://www.idsociety.org/Topic_Antimicrobial_Resistance/). Accessed July 21, 2014.

Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code. Smeeth L, Iliffe S. Community screening for visual impairment in the elderly. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(2):CD001054. doi:10.1002/14651858.CD1001054.

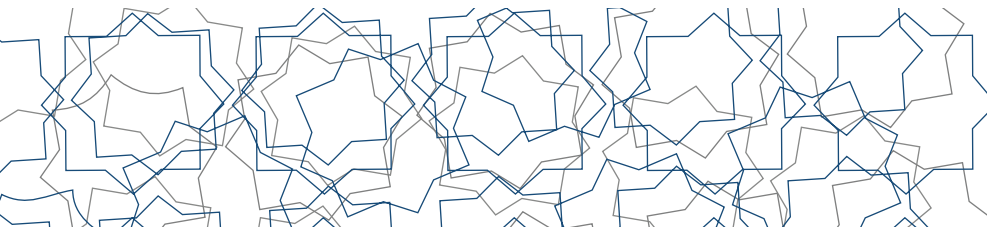
5) Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International The National Library of Medicine (NLM, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

## **Tables**

- 1 Large tables must be avoided. Reversing columns and rows which often reduce the dimensions of a table are preferable.
- 2 If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
- 3 All the tables numbered according to their sequence in the text has to be submitted in separate pages. But the possible place for statement of each Table has to be identified in the text. The text should include references to all tables.
- 4 Each table should have a brief and explanatory title.
- 5 Column headings should be brief and clear in meaning. Standard abbreviations of units of measurement should be used in parentheses.
- 6 Vertical or horizontal lines should not be used to separate columns and rows.
- 7 Only essential explanations for understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.
- 8 In case of data taken from another publication used in the Table, the reference has to be cited as table footnote and also shown in the reference list.

## **Figures**

- 1 All Figures should be submitted as separate pages. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text and possible place for statement of each has to be identified in the text. References should be made in the text to each illustration.
- 2 Each illustration should have a caption.
- 3 Explanations should be given in the figure legend(s).



## **COPYRIGHT RELEASE FORM**

Journal of Research in Veterinary Medicine (JRVM)

Uludag University Faculty of Veterinary Medicine, 16059, Nilufer, Bursa, Turkey

**Manuscript title:**

**Full names of all authors (in order to appear on manuscript):**

**Name, address etc. of corresponding author:**

**E-mail:**

On behalf of all authors, as the corresponding author of the manuscript, I warrant that

- 1) The manuscript submitted is my/our own original work.
- 2) All authors participated in the work in a substantive way and are prepared to take public responsibility for the work.
- 3) I was authorized by all authors to transfer all royalties related with the manuscript and to enter into a binding contact with Bursa Uludag University as detailed in this Copyright Release Form, and I will be responsible in the event of all disputes that have occurred and that may occur.
- 4) All authors have seen and approved the manuscript as submitted.
- 5) E-mail and street addresses of all authors have been entered into the DergiPark Manuscript Submission and evaluation System correctly.
- 6) The manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere.
- 7) The text, illustrations, and any other materials included in the manuscript do not infringe upon any existing copyright or other rights of anyone.
- 8) I transfer all financial rights, especially processing, reproduction, representation, printing, distribution, and online transmittal, to Uludag University with no limitation whatsoever.

Notwithstanding the above, the Contributor(s) or, if applicable the Contributor's Employer, retain(s) all proprietary rights other than copyright, such as

- 1) Patent rights;
- 2) To use, free of charge, all parts of this article for the author's future works in books, lectures, classroom teaching, or oral presentations;
- 3) The right to reproduce the article for their own purposes provided the copies are not offered for sale.

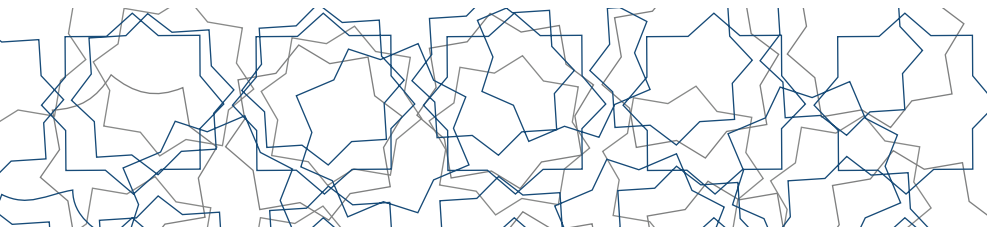
However, reproduction, posting, transmission or other distribution or use of the article or any material contained therein, in any medium as permitted hereunder, requires a citation to the Journal and appropriate credit to Uludag University as publisher, suitable in form and content as follows: Title of article, author(s), journal title and volume/issue, Copyright© year.

As the corresponding author, I also warrant that "Bursa Uludag University and the Journal Editors" will not be held liable against all copyright claims of any third party or in lawsuits that may be filed in the future, and that I will be the only person who will be liable in such cases. I also warrant that the article contains no libellous or unlawful statements, I/we did not use any unlawful method or material during the research, I/we obtained all legal permissions pertaining to the research, and I/we adhered to ethical principles during the research.

**Corresponding Author's Full Name:**

**Date and Signature:**





## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### MAKALELER / RESEARCH ARTICLES

- Nosema Ceranae ile Doğal Enfekte Balarısı Kolon ilerinde 10- 14  
Noseba®'nin Etkinliğinin Araştırılması  
**Levent AYDIN, Mehmet ÖZÜÇLİ, Ahmet Onur GİRİŞGİN,  
Yiğit ALTAV, Betül SAYGIN, Nurgül ÇİMENLİKAYA, Suna Aslı ZENGİN**
- Ultrasound Follow-up Of Adhesions After One-Step Laparoscopic 15- 20  
Abomasopexy for Correction of Left Displaced Abomasum in Cattle  
**Göksen ÇEÇEN AYALP, İsmail Altuğ ŞEN,  
Nihal Yaşar GÜLSATAR, Sibel TOKOĞLU SERT**
- The Effects of Different Monochromatic Colors on 21- 25  
Oxidant Antioxidant Balance in Broilers  
**Nilay SEYIDOĞLU, Deniz BELENLİ,  
Oguz MERHAN, Kadir BOZUKLUHAN**
- Diyarbakır İlinde Yetiştirilen Ruminantlarda S olunum Sistemi Viruslarının S 26- 33  
eroprevalansı ve Pestivirus Varlığının Araştırılması  
**Berfin KADİROĞLU, Gizem AYTÖĞÜ, Kadir YEŞİLBAĞ**
- Türkiye'de Yarış Atlarında Tendinitis ile Etiyolojik Faktörler Arasındaki İlişki: 34- 44  
Atlarla İlişkili Parametrelerin Etkisi  
**Ülke G. ÇALIŞKAN , Deniz SEYREK-İNTAŞ, Nureddin ÇELİMLİ**
- Antimikrobiyal Dirençli Escherichia Coli'de Geniş Spektrumlu 45- 48  
B-Laktamaz Direncinin Araştırılması  
**Murat CENGİZ, Ulvi İBRAHİMLİ**
- The Morphometric Examination of Head Area of Black Headed 49- 53  
Gulls (*Larus Ridibundus*) from Marmara Region  
**Ozan GÜNDEMİR, Gülsün PAZVANT, Nazan GEZER İNCE**
- Effects of Lacosamide in Rats with Lipopolysaccharide Induced Hepatic Pathology 54-60  
**Ozlem OZMEN, Volkan IPEK**
- A Phylogenetic and Genotyping Study of Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV-4) in Turkey. 61- 66  
**B. Taylan KOÇ**

## **Nosema Ceranae ile Doğal Enfekte Balarısı Kolonilerinde Noseba®'nin Etkinliğinin Araştırılması**

**Levent AYDIN<sup>1</sup>, Mehmet ÖZÜİÇLİ<sup>1</sup>, Ahmet Onur GİRİŞGİN<sup>1</sup>,  
Yiğit ALTAV<sup>2</sup>, Betül SAYGIN<sup>1</sup>, Nurgül ÇİMENLİKAYA<sup>1</sup>,  
Suna Aslı ZENGİN<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye

<sup>2</sup> Arion İlaç Ar&Ge Merkezi, Tuzla - İstanbul

<sup>3</sup> Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş., Tuzla -İstanbul

Received 2019-07-18 Accepted 2020-02-15

### **Özet**

Bu çalışmada, Arion İlaç Ar-Ge Merkezi ve Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş. tarafından geliştirilen, *Origanum minutiflorum* ve *Laurus nobilis* e-sansiyel yağ karışımı ile vitamin bileşiklerinin (Noseba®), Nosemosis ile doğal enfekte balarısı kolonilerinde etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bursa yöresi İkizce köyünde Mayıs 2019'da 10'ar çerçevesi kolonilerden sindirim yönteminde pozitiflik/negatiflik kontrolü için kovan başı en dış çerçeveden 30'ar arı muayene edilip, pozitif çıkan kolonilerden Neubauer lamına alınarak ışık mikroskopunda 40x10 büyütmede sayılıp Shimanuki-Knox formülü ile arı başına düşen spor sayısı tespit edilmiştir. Pozitif kovanlar spor sayıları dikkate alınarak 7'şerli 4 gruba ayrılmış, toplam 28 kovan çalışmada kullanılmıştır. Üç ayrı deneme grubunda 1 lt 1:1'lik şeker şurubuna sırasıyla 20, 40 ve 80 cc Noseba® karıştırılmış, Nosema-pozitif bir adet kontrol grubu ise deneme sonuna kadar tedavi edilmeden bırakılmıştır. Nosema sayımını takiben 2 gün üst üste 0,5 lt Noseba® karışımları tedavi gruplarındaki kolonilere oral yolla verilmiştir. Tedavi sonrası +1, +5, +10 ve +15. günlerde tekrar spor sayımı yapılmış, kontrol grubu ile istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırası ile 1. tedavi grubu %34,2; 2. tedavi grubu %67,2 ve 3. tedavi grubu % 99,9 etkili bulunmuş, kontrol grubu çalışma sonunda 3. tedavi grubu (80 cc) ile tedavi edilmiş ve %99,9'luk etkinlik saptanmıştır. Çalışma süresince Noseba®dan kaynaklı hiçbir yan etki ve koloni kaybı görülmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Balarısı, Nosema ceranae, Noseba, Etkinlik

### **Abstract**

In this study, we aimed to determine the effectiveness of Noseba® which is developed by Arion Drug Research Center and Bavet Drug Corporation which containing *Origanum minutiflorum* and *Laurus nobilis* essential oil mixture with vitamin, in honeybee colonies naturally infected with Nosemosis. In May 2019, 25 individual bees were examined from the outer frame of the hive, for the control of positivity and negativity from the colonies with ten frames in the İkizce village of Bursa region. The number of spores per bee was determined with Shimanuki-Knox formula by using Neubauer slide from the positive colonies and counted at 40 × magnification under the light microscope. Positive hives were divided into four groups considering the number of spores, each group consisted of 7 hives and a total of 28 hives were used in the study.

In three treatment groups, Noseba® solution was added into one litre of 1:1 sugar syrup with amounts of 20, 40 and 80 cc, respectively. One positive control group was remained untreated until the end of the experiment. 0.5 lt of Noseba® mixture were given orally to the colonies in the treatment groups for two consecutive days following the Nosema count. +1, +5, +10 and +15 days after treatment were re-counted and compared with the control group statistically. As a result, when compared with the control group, the first treatment group was 34.2%, the second treatment group was 67.2% and the third treatment group was found 99.9% effective, respectively. The control group was treated with the mixture as were used in the third treatment group (80 cc) at the end of the study and 99.9% efficacy was determined. No side effects and colonyloss were observed from Noseba® during the study.

**Keywords:** Honeybee, Nosema ceranae, Noseba, Efficiency

\* Corresponding author: : Mehmet ÖZÜİÇLİ, Tel No: 05543341870; E-mail: mehmetozuicli@uludag.edu.tr



## Giriş

Arılarda hastalığa neden olan etkenler; mantarlar (*Nosema apis*, *N. ceranae*, Ascospherosis ve Aspergillois), amip (*Malpighamoeba mellifica*), gregarinler, flagellatlar (*Leptomonasapis*, *Crithidiamellifica*), helmint nematodlar (*Mermis albicans*, *Parachordodes tolosanus*, *Agamomermis sp.*, *Neoaplectana carpocapsae*), bakteriler, virüsler ve artropodlardan (insekta ve akar sınıflarında) yaklaşık 119 etken bulunmaktadır.<sup>1,2</sup> Son yıllarda ortaya çıkan CCD-Koloni Çökme Bozukluğunun ana sebepleri bal arılarında gözlemlenen Varroosis, Nosemosis, Trachea akarı vb. gibi arı zararlılarıdır.<sup>1</sup> *N. apis* ve *N. ceranae* ergin bal arılarında (*Apis mellifera*) Nosemosis'e neden olur ve bu etkenler ergin arılarının sindirim sistemine yerleşir. Nosemosis en yaygın arı hastalıklarından birisidir ve dünya çapında önemli arı kayıplarına neden olur.<sup>3,4</sup> Bu hastalık direkt olarak; sindirim sistemi bozukluklarına, arıların ortalama ömrünün kısalmasına, koloni sayısının azalmasına neden olur. İndirekt olarak; bal üretiminin ve polen toplamanın azalmasına ve kolonide önemli kış kayıplarına neden olur.<sup>5,6</sup> Nosemosis; bakteriyel, viral ve protozoal hastalıklarla birlikte görülebilir. Bu durum arı kolonisi sağlığını, arı ürünleri ve üretimini olumsuz yönde etkiler. Her canlıda olduğu gibi bal arılarında da birtakım hastalık etkenleri gözlemlenmekte, koloni sağlığı ve devamlılığını olumsuz yönde etkilemektedir.<sup>5,7</sup> CCD'ye (Colony Collapse Disorder) birçok faktör neden olabilir.<sup>8</sup> Bu faktörlerden en önemlilerinden biri de Nosema cinsinde yer alan *N. apis* ve *N. ceranae* etkenleridir.<sup>9,10</sup>

Yapılan çalışmalarda Nosemosis Bursa yöresinde<sup>11,12</sup> % 26, Kars yöresinde<sup>13</sup> %15,74, Elazığ yöresinde<sup>14</sup> %8,7, Muğla bölgesinde<sup>15</sup> %100, Bingöl yöresinde<sup>2</sup> %26,16, Trakya bölgesinde<sup>16</sup> %6,5, Hatay yöresinde<sup>17</sup> ise %10 oranında bildirilmiştir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda fumagillin içeren preparatlar kullanılmasına karşın *N. ceranae* enfeksiyonlarına karşı etkinlikleri %70'leri aşmamıştır. Aynı zamanda Varroosis enfestasyonları ile birlikte miks seyreden Nosemosis olgularında Varroa ilaçlarının yeterince görev yapmadığı da bildirilmekte, bu nedenle öncelikle Nosemosis'in kontrol altına alınması gerekmektedir.<sup>18</sup> Bu çalışmada doğal bir ürün olan ve kalıntı problemi olmayan, Arion İlaç Ar-Ge Merkezi ve Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş. tarafından geliştirilen bitkisel esansiyel yağ karışımı ile vitamin bileşiklerinin Nosemosis ile doğal enfekte balarısı kolonilerinde etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

Bu çalışmada ergin arı örnekleri Bursa (İkizce köyü) yöresinden toplanmıştır. Nosemosis varlığının tespiti için en dış çerçeveden kovan başı 30'ar adet arı örnekleri alınmıştır. Laboratuvara getirilen canlı arı örnekleri hareketsiz kalmaları için derin dondurucuda bir gün bekletilmiştir. Bir gün sonra, hareketsiz kalan arılar digestion yöntemiyle Nosema varlığı yönünden incelenmiştir.

Digestion yönteminde pozitiflik/negatiflik kontrolü için kovan başı 10'ar arı muayene edilerek 10 arının abdomeni bisturi yardımı ile kesilmiştir. Abdomenleri bir havana alınarak her abdomen için 1 ml olmak üzere 10 ml distile su ilave edilmiştir. Uygun bir bağıet yardımı ile iyice ezilip, solüsyon homojen hale getirilerek lam-lamel arasına pipetle bir damla alınarak 40x10 büyütmede ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse E100) Nosema sporları yönünden muayene edilmiştir. Pozitif bulunan örneklerden her koloni için 20'şer arı numunesi yukarıda anlatılan digestion yöntemiyle hazırlanıp solüsyonlarından birer damla Neubauer lamına alınıp, ışık mikroskopunda 40x10 büyütmede beş büyük ve her biri 16 adet küçük kare içeren sayım alanındaki Nosema sporları sayılmıştır. Arı başına toplam spor sayısı (N) şu formülle bulunmuştur:<sup>19,20</sup>  $N = S \times 4 \times 10^6 / 80$ . Etkenin tüm Bursa yöresinde *N. ceranae* olduğu, PCR ile daha önce saptanmıştır.<sup>21</sup> Bu çalışma da aynı sabit arılıkta yapılmış ve dışarıdan yeni bir koloni girişi olmamıştır. Yapılan ilk Nosema spor sayımları sıfırıncı gün sayımları olarak kaydedilmiştir. Pozitif koloniler spor sayıları dikkate alınarak yedişerli dört grup oluşturulmuştur. Toplam 28 kovan çalışmada kullanılmıştır. Noseba ticari ürünü *Origanum minutiflorum* ve *Laurus nobilis* bitkilerinin esansiyel (uçucu) yağlarından ve vitamin karışımından oluşmaktadır. Birinci grup tedavisiz kontrol, 2. grup 20 cc Noseba+1 litre şeker şurubu, 3. grup 40 cc Noseba+1 litre şeker şurubu ve 4. grup 80 cc Noseba+1 litre şeker şurubu ile hazırlanarak, sayımı takiben iki gün üst üste 0,5 lt tedavi gruplarındaki kovanlara oral yolla verilmiştir. Tedavi sonrası +1, +5, +10 ve +15. günlerde tekrar sayım yapılmış ve kontrol grubu ile yüzde azalma istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Saha denemeleri 10.04.2019-25.04.2019 tarihleri arasında yapılmıştır

## Bulgular

Çalışmada kullanılan 28 pozitif kovanda tedavi öncesi ortalama arı başına Nosema spor sayısı 17,8 milyon gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Kontrol grubu ve tedavi uygulanan 3 grubun elde edilen sonuçları tabloda verilmiştir.

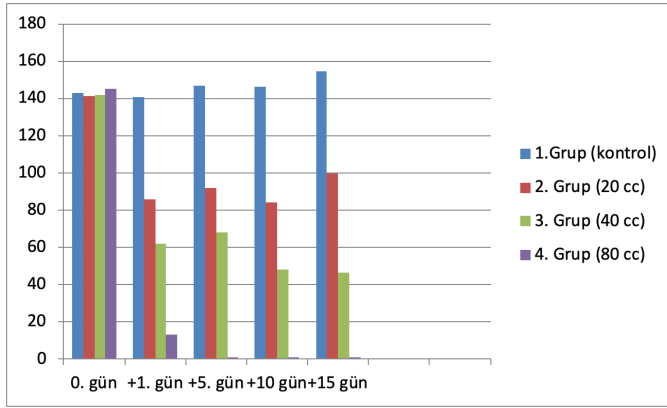
Tablo 1: Nosemosis ile doğal enfekte bal arısı kolonilerine Noseba'nın Etkisi

*Protokol no	**TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI ARI BAŞINA SPOR SAYISI				
	0. gün	+1. gün	+5. gün	+10. gün	+15. gün
1. Grup (kontrol)	143	140,7	147	146	154,6
2. Grup (20 cc)	141,2	86	92	84	99,9
3. Grup (40 cc)	142	62	68	48	46,6
4. Grup (80 cc)	145	13,4	1	1	1

\*Her grup 7 pozitif (10 çerçevesi) koloniden oluşmaktadır

\*\* Toplam x 10 6 her koloni için spor sayısı

Grafik 1: \*\*Tedavi Öncesi ve Sonrası Arı Başına Spor Sayısı



\*Her grup 7 pozitif (10 çerçevesi) koloniden oluşmaktadır.

\*\* Toplam x 106 her koloni için spor sayısı.

Tedaviyi takiben 2.grup kovanlarda spor sayılarında dalgalanma olmuş, 15. günde %34,2 etkinlik sağlanmıştır. 15 gün sonunda iki kovan tamamen menfi olmuş, 3.grupta ise kolonilerde 5. günden itibaren spor sayısında büyük düşüş göstermesine rağmen 15. günde etkinliğin %67,2'lerde olduğu saptanmıştır. Bu grupta bir kovan menfi olmasına karşın üç kovanda spor sayıları tedavi öncesine göre % 5'lere inmiştir. Dördüncü grupta tedavi sonrası 1. günde etkinlik %93,1'e ulaşmış, 5. günden itibaren sadece bir kolonide toplam 7 spor görülmüş, 15. Günde sadece bir kovanda iki adet spor tespit edilmiştir. Dördüncü tedavi grubu % 99,9 etkili bulunmuştur. Tedavi sonrası 30 günde tüm koloniler tekrar kontrol edilmiş, tedavi gruplarında spor sayıları korunmasına karşın kontrol grubu kolonileri aşırı zayıflayarak 4-5 çerçevesi duruma geçmiştir. Bu nedenle 250 cc x 2 defa (Noseba 80cc+1litre şurup) hesabı ile şuruplanarak 15 gün içinde eski durumlarına gelmiş ve 4.gruptaki etkinlik aynı şekilde tespit edilmiştir. Tedaviden kaynaklanan anormal derecede arı ölümleri gözlemlenmemiştir. ve koloni kaybına rastlanmamıştır.

## Tartışma ve Sonuç

Nosemosis son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın bir şekilde görülmektedir. Özellikle Nose-

ma ceranae N. apis'e göre daha patojen, hızla kolonilerin sönmesine yol açan bir türdür ve arıların için ciddi tehdit oluşturmaktadır.<sup>8,9,21</sup> Fumagillin etken maddesinin N. ceranae enfeksiyonlarında etkinliğinin sınırlı kalması ve/veya Avrupa Birliği ülkelerinde sınırlandırılması-yasaklanması ile esansiyel yağ, vitamin ve mineral karışımlarının arı hastalık etkenlerine karşı kullanımı artmıştır.<sup>22</sup> Yapılan çalışmalarda N. ceranae'nın fumagilline karşı direnç geliştirmeye başladığı, bir antibiyotik türevi olması, bazı durumlarda fumagillinin spor üremesini baskılayamadığı ve değişken etki gösterdiğinden dolayı fumagillinin üretimi durdurulmuştur.<sup>23,24</sup> Günümüzde Nosemosis tedavisinde bitkisel kökenli ilaçlar veya yem katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bitkisel etken maddelerden daha çok timol, sarımsak özü, nane özü, şalgam özünün ticari veya elde hazırlanan preparatları kullanılabilir. Özellikle timol, bağırsaklarda patojen mikroorganizmaların gelişimini engelleyici etkisi, balda kalıntı bırakmaması ve arıya zarar vermemesinden dolayı daha fazla tercih edilmektedir.<sup>25,26</sup> Bu maddelere ilave olarak organik asitlerden okzalik asit<sup>27</sup> ve kabuklu deniz hayvanlarında bulunan kitosan da<sup>28</sup> spor miktarını belirgin olarak düşürmektedir. Son yıllarda Nosemosisli kolonilerde Fumagillin ile yapılan uygulamalarda Bursa yöresinde tedaviye net cevap alınamaması, Ütük ve ark. (2016)'ın belirttiği gibi arılarda N. ceranae'nın bulunduğu kanısını uyandırmaktadır.

Bu karışımların balda kalıntı bırakmaması da tedavide tercih sebebi olmalarına neden olmuştur. Ancak ülkemizde bugüne kadar hazırlanan bu tür içerikler ticarileşmesine karşın ciddi bilimsel verilere dayanmamaktadır. Genelde etkinlik testleri ile ilgili bilimsel veriler eksiktir.<sup>22</sup>

Bitkisel ekstreler, esansiyel yağlar ve organik asitlerle Nosemosis üzerine yapılan çalışmalarda, LD50 ve LD değerleri, ürünler kimyasal değil bitkisel tabanlı olduğu için yapılmamıştır.<sup>25,27</sup> Buna bağlı olarak Noseba üzerinde de LD50 ve LD çalışmaları yapılmamıştır.

Noseba'nın kullanıldığı tedavi gruplarında tarlacı arıların kovana giriş-çıkış sıklığının arttığı, tedaviye başlanmadan önce kovan önünde gözlemlenen zayıflamış arıların gözlemlenmediği, tedavi edilmeyen pozitif kontrol gruplarında; tarlacı arıların giderek zayıfladığı, kovan önünde uçamayan arıların toplandığı, Nosemosis belirtisi olarak arıların kanat açıklıklarının arttığı, kovana giriş-çıkışların azaldığı, hastalığa bağlı olarak kovandaki çerçeve sayısının giderek azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada ilk kez yeni bir ürün olan Noseba, kontrollü olarak Nosemosis ile doğal enfekte arı kolonilerine şeker



şurubu ile uygulanmış, %99,9 etkinlik tespit edilmiştir. Tedaviden kaynaklanan herhangi bir yan etki veya koloni kaybı görülmemiş, aksine koloniler hızla güçlenmiş ve ballık ilave edilmiştir. Ancak Nosema ile kontamine kolonilerde sporların bal ve petekte bir yıla yakın canlı kaldığı dikkate alınmalı<sup>18</sup>, bu ballı peteklerin değiştirilmesi gerekliliğinden yola çıkarak Noseba karışımının uygun dozajlarda kullanılması ile arı bakım ve beslenmesinin doğru yapılmasıyla Nosema enfeksiyonunun ciddi bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

## Kaynaklar

- Giray T, Çakmak İ, Aydın L, et al. Preliminary Survey Results On 2006-2007 "Colony Losses in Turkey. Uludağ Bee J. 2007; 7: 102-108.
- Aydın L. The status of honeybee parasites and predators in Turkey and againts control methods. International 2. Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress. October 5-8, 2010; Muğla-Turkey.
- Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honeybees. Vet Parasitol. 2010; 170(3-4): 212-217.
- Fries I. Nosema ceranae in European honeybees (Apis mellifera). J Inverteb Pathol. 2010; 103: 73-79.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, et al. How natural infection by Nosema ceranae causes honey bee colony collapse. Environ Microbiol. 2008; 10(10): 2659-69.
- Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses. J Apic Res. 2010; 49(1): 1-6.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, et al. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of Nosema ceranae, microsporidian parasite isolated from the European honey bee, Apis mellifera. J Eukar Microbiol. 2009; 56(2): 142-147.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science. 2007; 318(5848): 283-287.
- Paxton R. Does infection by Nosema ceranae cause Colony Collapse Disorder in honeybees Apis mellifera? J Apic Res. 2010; 49: 80-84.
- Chaimanee V, Warrit N, Chantaannkul P. Infections of Nosema ceranae in four different honey bee species. J Inverteb Pathol. 2010; 105(2): 201-210.
- Aydın L, Güleğen E, Çetinbaş H. Bursa yöresi bal arılarında Nosema apis'in (Zander, 1909) yaygınlığı. Bülteñdif. 2001; 17: 6-8.
- Aydın L, Çakmak İ, Güleğen E, et al. Honey bee Nosema disease in the Republic of Turkey. J Apic Res. 2005; 44 (4): 196-197.
- Topçu B, Arslan MÖ. The prevalence of Nosemosis in honeybee in the province of Kars. Uludağ Bee J. 2004; 4: 164-170.
- Şimşek H. Elazığ yöresi bal arılarında bazı parazit ve mantar hastalıklarının araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2005; 52: 123-126.
- Şimşek D. Muğla ili bal arılarının (Apis mellifera L.) mikrobiyal ve paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- Doğaroğlu M, Sıralı R. Survey results on honeybee pests and disease in Thracian Region of Turkey. Uludağ Bee J. 2005; 5: 71-78.
- Muz MN, Girişgin AO, Muz D, et al. Molecular detection of Nosema ceranae and Nosema apis in colony collapsed apiaries of Turkey. J Apic Res. 2010; 49(4): 342-344.
- Girişgin AO. Nosemosis. In: Doğanay A, Aydın L, eds. Bal Arısı Yetiştiriciliği, Ürünleri, Hastalıkları. Dora Yayıncılık. Bursa-Türkiye, 2017: 381-389.
- Gurgulova K, Valchovski R, Petrov P, et al. Distribution of Nosema apis and Nosema ceranae in Bulgaria. Diagnostic in honey bees. From sampling to data analyses. Beedoc-Cost Action. 2010; Ghent University, Belgium.
- Shimunaki H, Knox DA. Laboratory diagnosis of honey bee diseases. US. Department of Agriculture, Technical Bulletin, 1990.
- Ütük AE, Pişkin FÇ, Girişgin AO, et al. Microscopic and molecular detection of Nosemosis in Turkey. Apidologie. 2016; 47, (2): 267-271.
- Girişgin AO, Özüçli M, Aydın L. Situation of Nosema disease of honey bees and its treatment studies in Turkey. International 5. Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress. November 1-5, 2016; Muğla - Turkey.
- Williams GR, Shutler D, Little CM, et al. The microsporidian Nosema ceranae, the antibiotic Fumagillin-B, and western honey bee (Apis mellifera) colony strength. Apidologie. 2011; 42(1): 15-22.
- Huang WF, Solter LF, Yau PM, et al. Nosema ceranae escapes fumagillin control in honey bees. PLoS Pathog. 2013; 9(3): e1003185.
- Costa C, Lodesani M, Maistrello L. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of Nosema ceranae and on the longevity of honey bees (Apis mellifera L.) in laboratory conditions. Apidologie. 2009; 41 (2010): 141-150.
- Wiese N, Fischer J, Heidler J, et al. The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (Thymus vulgaris) inhibit growth of bee disease-associated microbes. Sci Rep. 2018; 8: 14634.
- Nanetti A, Rodriguez-Garcia C, Meana A, et al. Effect

of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Res Vet Sci.* 2015; 102: 167-172.

28. Saltykova E, Gaifullina LR, Kaskinova MD, et al. Effect of chitosan on development of *Nosema apis* Microsporidia in honey bees. *Microbiology.* 2018; 87(5): 738-743.

Makalede "Noseba" olarak belirtilen ticari isim firma tarafından "BEESEBA" olarak deęiřtirilmiřtir.

# Ultrasound Follow-up Of Adhesions After One-Step Laparoscopic Abomasopexy for Correction of Left Displaced Abomasum in Cattle

 **Göksen Çeçen Ayalp**<sup>1</sup>,  **İsmail Altuğ Şen**<sup>1</sup>,  
 **Nihal Yaşar Gül Satar**<sup>1</sup>,  **Sibel Tokoğlu Sert**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Bursa, Turkey

Received 2019-06-13 Accepted 2019-11-11

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the use of ultrasonography on the determination of the thickness of adhesion formation at the abomasopexy site in cows which had undergone one-step laparoscopic abomasopexy. Ten Holstein cows with left displaced abomasum (LDA) were included in the study. Animals were treated with one-step laparoscopic abomasopexy whilst standing. Postoperative ultrasonographic examinations were carried out starting immediately after surgery (day 0), and on days 28, 90 and 120 by using a 5 MHz linear transducer. The thickness of the adhesion formation was measured between the abdominal wall and the abomasum. Ultrasonographic image revealed the area of fixation on day 0 as a mild distorted subcutaneous tissue. A heterogeneous hypoechoic irregular-shaped mass (adhesion) was observed between the abomasum and abdominal wall on days 28, 90 and 120. Average thickness significantly ( $p < 0.05$ ) increased from day 0 to day 28, but tended to decrease afterwards. The average thickness at the abomasopexy site was recorded as 20.47, 22.82, 22.34 and 21.92mm on days 0, 28, 90 and 120, respectively.

Ultrasonographic examination can diagnose and measure adhesions between the abomasum and the abdominal wall. During the study period, adhesion formation was followed up to the 120th day, and in this period the thickness of the adhesion tended to decrease. Long follow-up studies are thought to be beneficial to determine the difference in adhesion thickness.

**Keywords:** LDA, one-step laparoscopic abomasopexy, ultrasound, adhesions, cattle

## Introduction

In recent years, laparoscopic abomasopexy (LA) techniques have gained an acceptance for correction of left displacement of the abomasum (LDA). The LA technique combines the minimal invasiveness and visual control for abomasal positioning and fixation offered by laparoscopy.<sup>4,11</sup> Janowitz (1998), described a two-step laparoscopically guided toggle pin (TP) fixation technique for LDA. The one-step procedure developed by Christiansen (2004) and Barisani (2004) involves placement of the TP suture within the abomasal lumen under laparoscopic guidance via the left paralumbar area in a standing cow. The other one-step procedures are performed via the ventral

abdominal wall with the animal positioned in dorsal recumbency.<sup>2,13</sup>

The advantages of one-step LA technique include confirmation of the LDA and the ability to evaluate adhesions between the abomasum and the left body wall or rumen. Furthermore, this technique can also be performed completely in a standing cow, is procedurally simpler, and requires less time compared with the two-step LA procedure.<sup>14</sup>

The success of these techniques depends on developing inflammatory adhesions in the abomasal fixation region and these adhesions prevent recurrence of AD during the

\* Corresponding author: Göksen Çeçen Ayalp, Address: Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 16059 Nilüfer, Bursa, Turkey. Telephone number: +90 224 294 08 40 E-mail: goksenc@uludag.edu.tr



current and the subsequent lactation.<sup>3,9</sup> The degree and persistence of adhesions formed after correction of LDA using the laparoscopic TP suture techniques and especially traditional laparotomy techniques are poorly characterized.<sup>14</sup> The strength and size of adhesions required to prevent recurrence after LA is unknown and further research is required to address this issue.<sup>3,14</sup> A few authors have reported follow-up data for the assessment of adhesions of the abomasum to the body wall after laparoscopic abomasopexy.<sup>1,3,18</sup> The presence or absence of adhesions, as well as their appearance at the site of the abomasopexy, were confirmed by laparoscopic visualization or necropsy findings.<sup>3,18</sup> The authors have reported repeat laparoscopy 90 days after surgery found strong adhesions between the abomasum and body wall in all ten cows positioning the cow in dorsal recumbency. Furthermore, strong adhesions were observed in four cows that underwent repeat laparotomy 1 year after LA.<sup>3</sup>

Ultrasonography, as a diagnostic imaging technique, provides reliable information concerning the abomasum and its contents, and the condition of its wall enables identification and assessment of any changes in adjacent structures.<sup>5,15</sup> It is possible to measure the size of fibrinous adhesions between the abomasum and the abdominal wall via ultrasonographic examination.<sup>1</sup> In only one study, ultrasonography was performed for the follow-up of adhesions in the postoperative period of two-step LA.<sup>1</sup> To our knowledge, there is no other study in the literature about ultrasound follow-up of adhesions after one-step LA for correction of LDA.

The goal of this study was to evaluate adhesion formation and measure adhesion thickness at the fixation area by using ultrasonography in a 4-month follow-up after one-step LA procedure for correction of LDA in the standing cow.

## Materials and Methods

This study plan was approved by Local Ethics Committee of Uludag University (Decision no: 2014-13/03). Ten Holstein cows with LDA were used for this study. Each animal was subjected to a general physical examination and special examination of the gastrointestinal system. The day prior to surgery, cows were examined transabdominally with ultrasound on the left side of the abdomen and was mainly focused on the examination of abomasal position and for the presence of adhesions. Ultrasonographic examinations were performed on non-sedated, standing cows using a 5.0 MHz linear transducer (Mindray Z6 Vet, Turkey).

Animals were treated with one-step laparoscopic abo-

masopexy. In the preoperative period, the cows received a single dose of flunixin meglumine (Finadyne®, Intervet Co., 2.2 mg/kg bodyweight, intramuscularly). The surgical site of the animal was aseptically prepared, and 2% solution of prilocaine hydrochloride (Citanest®, Astra Zeneca PLC) was infiltrated locally at the points of entry for the trocar/cannula units.

Surgery was performed in the standing animal. Standard equipment was used (Dr. Fritz GmbH, Germany). The first incision was made in the left paralumbar fossa behind the ribs and beneath the transverse processes and a trocar was inserted into the abdominal cavity (portal site 1). Pneumoperitoneum was obtained and the abdominal cavity was explored. For the second portal, the incision was made on the dorsal part of the 11<sup>th</sup> intercostal space. Next a trocar-cannula unit was inserted in the 11<sup>th</sup> intercostal space under laparoscopic guidance. The long trocar was used for the placement of the toggle and for emptying the air from the abomasum. A stainless steel toggle pin with 2 lengths of polyamide suture (synthetic pseudo-monofilament non-absorbable suture; Kruuse Supramid, USP 3+4) attached at its midpoint was inserted via the cannula into the abomasal lumen while the excess suture material remained exterior to the abdomen. The abomasum was deflated, and the excess suture material through with a long spieker were pushed down into the abdominal cavity and the needle was passed through the ventral aspect of the right abdominal wall and the threads were pulled. The two threads were passed through a rubber bottle cap and then knotted together. The abdomen was deflated and the incisions on the left abdomen were closed by polydioxanone suture (Monoplus, USP 2, Braun Aesculap, Tuttlingen) material.

In the postoperative period, the cows received ceftiofur hydrochloride (Excenel®, Zoetis Inc., 1.1 mg/kg bodyweight) intramuscularly once a day for 3 days. After laparoscopic abomasopexy, the animals were discharged on the day of surgery and allowed to mix with other cows. However, their feeding was kept under control the day after surgery. All cows were fed with half rations for the first three post-operative days and the following days were gradually increased. Full ration was started 7 days after surgery. Clinical follow-up of the animals was done on days 0, 28, 90, and 120. Skin sutures on the left abdomen were removed on day 14. Fixation sutures were not removed.

For the postoperative ultrasonographic examination, the abomasum fixation area was investigated in transverse and longitudinal directions by using a 5 MHz linear probe (Mindray Z6 Vet, Turkey) in each case on days 0, 28, 90,



and 120. The abomasum, its contents and the condition of its wall and the adhesion formation were evaluated and the thickness of the adhesion was measured between the abdominal wall and the abomasal wall.

**Statistical Analysis:** Data were analyzed by the GLM procedure. Model was specified as full factorial and polynomial. Post Hoc Multiple Comparison was chosen by Tukey HSD Test. Bonferroni was chosen as certainty at interval adjustment. Differences were considered significant at a probability level of  $p < 0.05$  in all analyses. All statistical analysis was performed with SPSS software (version 23.0, SPSS Inc, USA) statistical program. The continuous values were given as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## Results

The cows with LDA had a mean age of  $38.7 \pm 21.9$  (SD) months ranging from 24 to 96 months. The mean weight was  $497.5 \pm 65.5$  kg (SD) with a range of 425 to 600 kg. The duration of illness ranged from 1 to 7 days with a mean of  $3.9 \pm 2.13$  days (SD). All LDA cases were diagnosed after hearing classical resonant sounds (pings) on simultaneous auscultation and percussion of the left flank, especially over the last three ribs during clinical examination. In cows the abomasum was imaged with transabdominal ultrasonography over the left middle to upper third of the abdomen especially at the 11–12th intercostal space and no adhesions were detected.

One-step laparoscopic abomasopexy was successfully performed in all 10 cows. No abdominal organs were accidentally perforated during the entrance of the trocar and no major complications were encountered during surgery. During exploration of the abdominal cavity, the distended abomasum was observed between the rumen and the abdominal wall on the left side. No other pathological findings such as free fluid, adhesion or lesions were recorded. The median operation time, which was defined as the time required to insert the trocar and close the wound, was 46 minutes (range, 29 to 76 min). The suture material was cut in some cases (cows 2, 4, and 8) by the lancet contained within the spieker during the placement of the suture in the right paramedian area. In these cases, this phase of the operation was repeated. This caused a prolongation of the operation time (mean 35 min).

In the postoperative period, gastrointestinal motility was restored within hours after surgery. The demand for water and hay increased in the postoperative period. Only in one case (case no. 9) recurrence of LDA was observed on day 129. The animal was re-operated.

The macroscopic appearance of the site of fixation (the tissue under and around the rubber bottle cap) in all cows showed swelling with mild pain (inflammation) on day 28. The swelling noticeably decreased on successive examination days and was replaced by scar tissue. There was no suture material at the fixation site examined on day 90.

**Ultrasonographic findings:** The abomasal wall appeared as an echoic line. The ingesta were mostly homogeneous in all cows. In 9 of the 10 cows, abomasal contractions were normal (passive and slow movement) but an active movement of the abomasum was noticed in one case. A heterogeneous hypoechoic irregular-shaped mass (adhesion formation) was located between the abomasum and abdominal wall in all examinations (on day 28, 90 and 120).

On examination day 0, the area of fixation was observed as a mild distorted subcutaneous tissue. The location of the toggle-pin was found at a central position within the abomasum in relation to the fixation area with the presence of a comet-tail artifact. In this area, the thickness values varied from 14.29 to 27.39 mm; the average being  $20.38 \pm 3.86$  mm (mean  $\pm$  SD).

On examination day 28, the toggle was visible in all cows as a hyperechoic object with a comet-tail artifact but the location was different. The toggle-pin position changed cranially or caudally from the fixation area. The thickness values were 16.90 to 30.10 mm; the average being  $22.68 \pm 3.75$  mm (mean  $\pm$  SD) (Figure 1).

Figure 1. A transverse (medial-lateral) ultrasound image on day 28 postoperatively (case 6). The toggle-pin (↘) presenting the characteristic feature of a comet-tail shadowing artifact (↙). (D): the distance between the abdominal wall and the toggle-pin, (l): Abomasum wall.

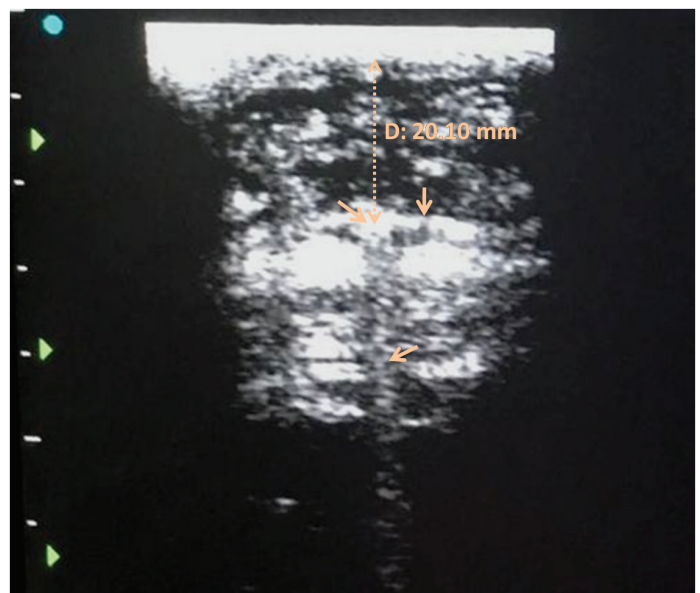
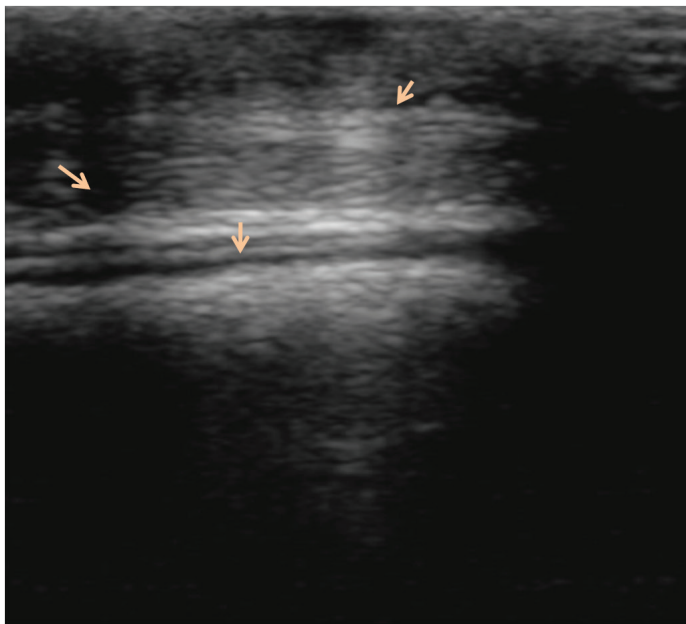


Figure 2. A longitudinal (cranial-caudal) ultrasound picture on day 120 postoperatively (case 10) presenting irregular shaped adhesion site (↙) which a hypoechoic area with small hyperechoic spots (↘), the abomasum wall (l).



On examination day 90, the toggle-pin was not evident in ultrasound images in all cattle. The thickness values decreased in comparison with the earlier period and were measured as 12.63-27.87 mm, the average being  $21.85 \pm 4.23$  mm (mean  $\pm$  SD).

On examination day 120, the thickness values varied from 19.91 to 27.70 mm; the average was  $21.91 \pm 2.54$  mm (mean  $\pm$  SD). On the ultrasound image, there was a hypoechoic area with small hyperechoic spots (Figure 2).

A significant increase ( $p < 0.05$ ) was observed regarding the adhesion thickness from day 0 and 28, and tended to decrease afterwards ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

Table 1. Ultrasonographic measurement values taken on different days of examination

Days of examination	Ultrasonographic measurement values (mm) (Mean $\pm$ Standard Deviation)
0	20.47 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>
28	22.82 $\pm$ 1.13 <sup>bc</sup>
90	22.34 $\pm$ 0.90 <sup>ac</sup>
120	21.92 $\pm$ 0.90 <sup>ac</sup>

p value: 0-90:  $p < 0.080$ ; 28-120:  $p < 0.057$ ; 90-120:  $p < 0.066$

## Discussion and Conclusion

One-step LA has been considered an advancement of the two-step laparoscopic technique, and is characterized by the ventral fixation of a toggle suture by using a spieker.<sup>16</sup> Our results show that one-step laparoscopic abomasopexy technique is advantageous in many ways, with shorter surgery time and faster postoperative recovery and characterized by higher food intake and lower incidence of

wound complications. Similar results have been reported in the literature.<sup>6,12,13,16</sup> The average surgical time in our study was higher than that reported in the literature (46 min).<sup>4,6,16</sup> This difference can be attributed to the number of cases in which the suture material was cut by the lancet contained within the spieker during the withdrawal of the spieker from the abdominal wall in this study (30%), which increased the surgical time. The lower experience of the surgeons in this study could also have contributed to the increased surgical time. Similarly, Perotta et al. (2017) reported that the toggle thread was cut off by the trocar tip in one cow (4.76%).

The rates of recurrence after one-step laparoscopic abomasopexy were reported between 1.97% and 9.52%.<sup>6,16</sup> In this study, one cow showed recurrence (10%) of displacement on day 129 after surgery because of a lack of adhesion. The animal was re-operated. However, recurrence was not observed in other cows during the subsequent lactation period.

The success of any operation to correct a displaced abomasum depends on the formation of an adhesion to hold the abomasum in position.<sup>7</sup> Abomasopexy and manipulations in the abdominal cavity cause adhesion formation at the site of operation.<sup>19</sup> Only a few authors reported follow-up data for the assessment of adhesions of the abomasum to the body wall after laparoscopic abomasopexy.<sup>1,3,18</sup> In these studies, the presence or absence of adhesions, as well as their appearance at the site of the abomasopexy, were confirmed by laparoscopic visualization or necropsy findings.<sup>3,18</sup> In only one study, ultrasonography was performed for the follow-up of adhesions in the postoperative period of two-step laparoscopic abomasopexy.<sup>1</sup> To our knowledge, there is no other study in the literature about ultrasound follow-up of adhesions after one-step laparoscopic abomasopexy for the correction of LDA.

Ultrasonography provides reliable information concerning the abomasum, its contents and the condition of its wall and various developments of adhesion-fibrous tissue formation in adjacent structures.<sup>1,15</sup> The adhesion-fibrous tissue area can be characterized and manifested as echogenic deposits and also as echogenic constricting bands or high-level echoes, as suggested by researchers.<sup>17</sup> Ultra-sonographic images of the toggle-pin show typical artefacts (comet-tail artifact) because of its metal structural nature.<sup>10</sup> In this study, ultrasonographic examination was performed in standing position by a 5 MHz linear transducer as suggested by other researchers.<sup>1,5,15</sup> The abdominal wall, abomasum content and wall of the abomasum, and

toggle pin were easily examined in this way.

Al-Bayati (2011) was able to detect the toggle-pin in ultrasonographic controls even on the 180<sup>th</sup> and 270<sup>th</sup> days after operation and also identified oval; round-shaped hypoechoic adhesions between abomasal and abdominal walls. In our study, the toggle-pin was detectable ultrasonographically on days 0 and 28, but could not be determined in any case on day 90. On the 90th day of the cases, there was no suture material on the fixation line. It was considered that the suture material had been continuously in contact with the abomasal content and therefore its strength was reduced and the threads were broken by organ movements. Ultrasonographically, the adhesion area showed a heterogeneous hypoechoic irregular-shaped mass between the abomasum and abdominal wall on examinations on day 28, 90 and 120. The adhesion thickness tended to decrease from day 28 to day 120. Similarly, in the study of Al-Bayati (2011), highest adhesion values were seen four weeks postoperatively and then decreased over time.

The localized inflammation at the site of fixation which was seen one month postoperatively may be due to the leakage of abomasal content into the wound area or as a result of the normal defense mechanism against the suture material.<sup>8</sup> In our study, the swelling at the fixation site noticeably decreased on day 90 and was replaced by scar tissue. This decrease in tissue reaction could be interpreted by the absence of suture material.

Although laparoscopic techniques have been widely accepted in clinical practice for treatment of LDA, information about the strength and size of adhesions required to prevent recurrence after LA is still inadequate and further research is required. To the best of our knowledge, this is the first report describing ultrasonographic follow-up of adhesions after one-step laparoscopic abomasopexy for correction of LDA. According to our findings, ultrasonographic examination provides useful information regarding adhesion formation at the abomasopexy site. Long follow-up studies are thought to be necessary for the evaluation of the size, thickness and quality of the adhesion formation in the postoperative period.

## Acknowledgements

This study was financially supported by the Scientific Research Projects Unit of Uludag University by the project number KUAP(V)-2014/8.

The authors would like to thank Hakan UZUN School of Foreign Languages, and İ. Taci CANGUL from Uludağ University, Faculty of Veterinary Medicine, Pathology Department for linguistic reading of this manuscript.

## Conflict of Interest Statement

The authors declared that they had no conflict of interest.

## References

1. Al-Bayati A. Development of abdominal adhesions after laparoscopic abomasopexy. (PhD Thesis) College of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University Gießen, 2011:38-82.
2. Babkine M, Desrochers A. Laparoscopic Surgery in Adult Cattle. *Vet Clin Food Anim.* 2005;21:251-279.
3. Babkine M, Desrochers A, Bouré L, Hélie P. Ventral laparoscopic abomasopexy on adult cows. *Can Vet Journal.* 2006;47:343-348.
4. Barisani C. Evoluzione della tecnica di Janowitz per la risoluzione della dislocazione abomasale sinistra secondo Barisani. *Summa* 2004;5:35-39.
5. Braun U. Ultrasonography in gastrointestinal disease in cattle. *Vet Journal.* 2003;166:112-124.
6. Christiansen K. Laparoskopisch kontrollierte Operation des nach links verlagerten Labmagens (Janowitz-Operation) ohne Ablegen des Patienten. *Tierärztl Prax.* 2004;32:118-121.
7. Connell J. Four Methods of Surgical Correction of Abomasal Displacement in the Cow. *Iowa State University Vet.* 1976;38:21-24.
8. Fecteau G. Peritonitis in the Ruminant. In: *Large Animal Internal Medicine.* 4th ed. Mosby, Elsevier, St Louis, 2008:850-855.
9. Freick M, Sieber I, Endtmann A, Passarge U, Passarge O. Laparoscopic reposition of the displaced abomasum in a dairy herd in Saxony (Germany) - a case series (Article in German). *Tierärztliche Umschau.* 2013;68: 311 - 321.
10. Grechenig W, Clement HG, Fellingner M, Schleifer P, Tesch PN. Ultrasound imaging and localization of metal implants. A clinical study. *Unfallchirurg.* 1996;22:117-123.
11. Janowitz H. Laparoscopic reposition and fixation of the left displaced abomasum in cattle. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 1998;26(6):308-313.
12. Mulon PY, Babkine M, Desrochers A. Ventral laparoscopic abomasopexy in 18 cattle with displaced abomasum. *Vet Surg.* 2006;33:347-355.
13. Newman KD, Anderson DE, Silveira F. One-step laparoscopic abomasopexy for correction of left-sided displacement of the abomasum in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:1142-1147.

14. Newman KD, Harvey D, Roy JP. Minimally invasive field abomasopexy techniques for correction and fixation of left displacement of the abomasum in dairy cows. *Vet Clin N Am-Food A*. Philadelphia, 2008;24(2):359-382.
15. Ok M, Arican M, Turgut K. Ultrasonographic findings in cows with left and right displacement of abomasum. *Revue Méd Vét*. 2002;15:15-18.
16. Perotta JH, Ollhoff RD, Naylor Lisboa JA, de Barros Filho IR. One-step laparoscopy for the correction of left abomasal displacement in high-yielding Holstein dairy cows. *Semina: Ciências Agrárias*. 2017;38:1313-1322.
17. Schmidt G. *Thieme Clinical Companions: Ultrasound*. 3rd ed. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag; 2007.
18. Thomas KL, Wilson DG, Bracamonte JI, Carmalt JL, Luby CD. Quality of Adhesions After Sutured Paramedian vs. Laparoscopic Toggle Abomasopexy in an Ovine Model. *Vet Surg*. 2016;45:488-493.
19. Zografos GC, Simeonidis KM, Messaris EG, Parasi AS, Sotiriou HG, Dontas IA. Adhesion formation and intraperitoneal catheters: histologic findings in a rat model. *Fertil Steril*. 2005;83:516-518.



## The Effects of Different Monochromatic Colors on Oxidant Antioxidant Balance in Broilers

 Nilay SEYIDOGLU<sup>1,\*</sup>,  Deniz BELENLI<sup>2</sup>,  
 Oguz MERHAN<sup>3</sup>,  Kadir BOZUKLUHAN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tekirdag Namik Kemal, TR-59030 Tekirdag TURKEY

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tekirdag Namik Kemal, TR-59030 Tekirdag TURKEY

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, TR-36100 Kars TURKEY

<sup>4</sup> Kars School of Higher Vocational Education, University of Kafkas, TR-36100 Kars TURKEY

Received 2019-11-01 Accepted 2020-02-13

### Abstract

Poultry management is associated with light due to positive effects of photoreceptors on animal's growth, immunity and homeostasis. Colors influence the efficiency of poultry performance and behavior. Light-emitting diode (LED) can use for providing monochromatic light source. In this trial, two hundred Ross 308 broiler chicks were studied in four different light groups as follows; White (Control), Red (RL), green (GL) and blue (BL) during 42 trial days. At the end of the study, the serum Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) enzyme activities were measured to evaluate the oxidant-antioxidant balance. The oxidant marker MDA was found the highest value in group RL ( $p:0.0001$  ;  $9.24\pm0.33$ ). On the other hand, in group GL, all antioxidant parameters were found the highest value ( $p<0.05$ ). Also, SOD and GPx values were increased in group GL (SOD:  $150.61\pm9.14$  ; GPx:  $186.96\pm10.50$ ) than BL (SOD:  $139.29\pm5.19$  ; GPx:  $160.02\pm3.15$ ) statistically ( $p<0.05$ ). The results showed that red light may be a stressor, and on the contrary, green light may be a positive monochromatic color for growth, oxidant-antioxidant balance and homeostasis for broilers.

Key words: poultry, green light, antioxidant enzymes, MDA

### Introduction

The light is converted to impulses to brain and effects on several physiological mechanisms<sup>1</sup>. Also, types of photoreceptors in the eye have a complex process for visual system. However there are some differences between human and animal vision. The human eye detects a narrow range between 400-700 nm wavelengths on the scale in the electromagnetic spectrum. On the other hand, chickens can perceive smaller wavelengths (350nm) than humans as superior. Thus, they can sense the wavelengths of light in the wider spectrum.<sup>2,3</sup> Chickens have seven photoreceptors in their eyes to separate the light colors. Besides

that, they have five light receptors in their eyes which get an ability to see many colors to them.<sup>4</sup> According to these structures, lightening is regarded an environmental stress factor for chicken's physiology and poultry management.<sup>5</sup> Many mechanisms are influenced by colors of light, especially growth performance, reproductivity, egg production and quality.<sup>6,7</sup>

Color is an important aspect of light due to its effect on several physiological mechanism and behavior in poultry. The artificial colors used for poultry management are named white, red, green and blue. Red light gives animal more activity such as walking, flapping, aggression and

\* Corresponding author: Nilay Seyidoglu, University of Tekirdağ Namik Kemal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology TR-59030 Tekirdağ TURKEY, Telephone: +902822504729, E-mail: nseyidoglu@nku.edu.tr



cannibalism.<sup>7,8</sup> Green and blue lights are called tranquilizer of the study. The chicks of one day age were placed in colors, and stimulate drinking, bathing, sleeping, sitting 4 deep cages in the trial room isolated from daylight which have positive impact on animal growth, reproductivity and immunity.<sup>7,9,10</sup> It was reported that both green and blue lights reduce negative effects of stress and maintains the immunity.<sup>11</sup> Also, increase of the antioxidant enzyme activities by blue light in poultry was determined by some researchers.<sup>12,13</sup>

The oxidant antioxidant balance in healthy status can be explained with superiority of antioxidant capacity. In animals, stressful situations such as long lightening, light colors, crowded, nutrition and etc. cause a damage in this balance, and oxidation is occurred.<sup>14</sup> Nevertheless, several pathological conditions could be existed in growth, immunity, reproductivity and animal products.<sup>15-17</sup> The first defense systems responded the cellular homeostasis are antioxidant enzymes.<sup>18</sup> Malondialdehyde (MDA) is known as the most important molecule for oxidative status in tissue or cells. Belong to oxidative status, antioxidants are released to fight for homeostasis, however if they're insufficient, exogenous antioxidants could be given to regulate the oxidant antioxidant balance.<sup>19</sup> The best natural antioxidants in organism are carotenoids, glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), superoxidase dismutase (SOD) and catalase (CAT) which also act as a free radical scavenger by eliminate the lipid peroxidation and oxidative damages.<sup>20,21</sup>

Light-emitting diode (LED) is a popular monochromatic light source commercially. The advantage of LED lamps is single intensity of wavelength which has a narrow half band output.<sup>22</sup> LED light spectra impacts photoperiodic answer of birds. This effect of LED light influences the broiler's growth, behavior, immune response, physiological and biochemical alterations.<sup>23,24</sup> According to these literatures, it can be said that light management is important for improvement of poultry productivity and welfare of animals. In this trial, we aimed to determine the effects of three monochromatic LED lamps in colors red, green and blue on oxidant and antioxidant enzyme activities in broilers.

## Material Methods

### Birds and Housing

The experiment was carried out in chicken coops in the Animal Husbandry Facilities of the Agriculture Faculty, Tekirdag Namik Kemal University. The study was carried out with the permission of University Animal Experimentation Local Ethics Committee (Approval number: T2017-7-5). A total of 200 Ross 308 broiler chicks were obtained from a parent flock randomly mating for animal material

and a black screen was drawn between each compartment. The birds were housed d 0 in separate rooms.

Groups were divided into 4 as follows respectively: White light (Control, 400-760 nm), Red light group (RL, 635-700 nm wavelength), Blue light group (BL, 450-490 nm wavelength) and Green light group (GL, 490-560 nm wavelength). Each trial group was randomly allocated 50 animals. LED lighting fixtures were mounted on each cage and adjusted so that there was no reflection on the other cages. The LED lamps were placed 10 cm above the head of broilers. The light was arranged period of 23 hour (23L:1D). Chicks were fed with 24% HP and 2900 kcal/kg ME powdered feed throughout the trial and ad libitum access to feed and water during 42 trial days.

### Blood samples and Antioxidant Status

Birds were slaughtered at the end of the trial and the blood samples were taken from jugular vein at the slaughter day. 10 of each group totally 40 samples were collected into anticoagulant blood tubes. Plasma was obtained by centrifugation at 3000 g for 10 minutes and stored at -20 °C until analyses day. Antioxidant enzymes in plasma such as Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx) enzyme activities were measured with commercial kits (Cayman Chemical Company, USA) by microplate reader and malondialdehyde (MDA) levels were measured according to the colorimetric method by Yoshiko et al.<sup>25</sup> with spectrophotometer.

### Statistical analysis

All the values were grouped and calculated as means  $\pm$  standard errors. Statistical analyses performed with SPSS (Version 20.0). All parameters were examined by One-way for the difference between groups and considered significant at  $p < 0.05$ . If the difference between groups was provided to be significant ( $p < 0.05$ ), Tukey's test used.<sup>26</sup> Nevertheless, Kruskal Wallis was used for analyzed the differences between means in non-homogenous groups, and following Mann Whitney U test applied between groups one by one.<sup>27</sup>

## Results

In the study, the oxidant marker, MDA, was determined for stressful condition. The MDA value was increased in group red light (RL) compared to group Control ( $p < 0.0001$  ;  $5.48 \pm 0.12$  and  $9.24 \pm 0.33$ , group

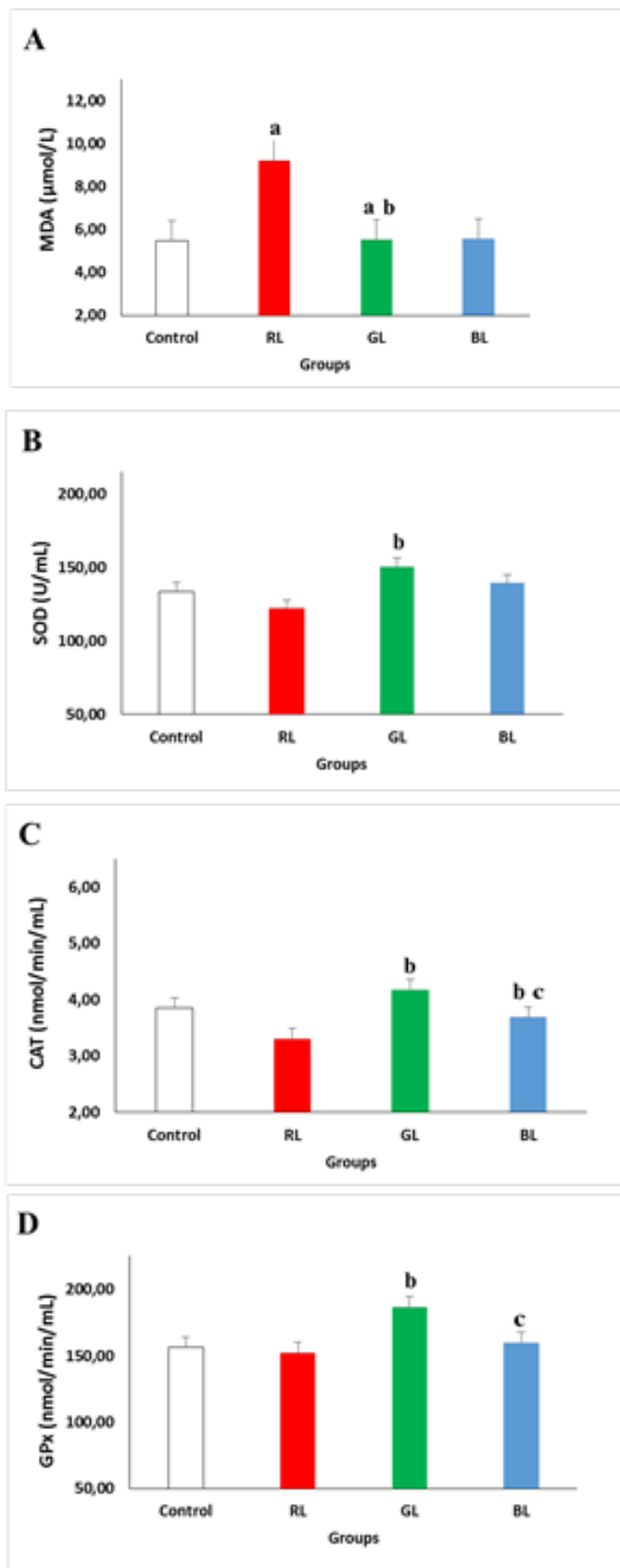


Figure 1: The effect of monochromatic light differences on the change of serum oxidant and antioxidant values. A) Malondialdehyde (MDA) enzyme value; B) Superoxide dismutase (SOD) enzyme value; C) Catalase (CAT) enzyme value; D) Glutathione Peroxidase (GPx) enzyme value.

Groups: Control, RL: red light, GL: green light, BL: blue light, respectively.

\*  $p < 0.05$ , RL, GL and BL versus C group

≠  $p < 0.05$ , GL and BL versus RL group

+  $p < 0.05$ , GL versus BL group

were found higher in groups GL (SOD, CAT and GPx respectively;  $150.61 \pm 9.14$ ,  $4.18 \pm 0.07$  and  $186.96 \pm 10.50$ ) and BL (SOD, CAT and GPx respectively;  $139.29 \pm 5.19$ ,  $3.69 \pm 0.08$  and  $160.02 \pm 3.15$ ) compared to Control group (SOD, CAT and GPx respectively;  $133.68 \pm 8.49$ ,  $3.86 \pm 0.18$  and  $156.14 \pm 5.67$ ) statistically (Fig1b-1c-1d ;  $p < 0.05$ ). On the other hand, between group Green and Blue, differences were found in SOD and GPx statistically (SOD and GPx  $p$  values respectively, 0,007 and 0,038).

## Discussion and Conclusion

In poultry management, lightening procedure is important due to the chickens' sensitivity to light color or lightening periods. Light has a stimulating effect on photoreceptors that results in release of hormones for development of stress and aggression.<sup>28,29</sup> To evaluate the stress which from oxidant and antioxidant capacity is necessary to define. Organisms have specific molecules for determining this oxidation cellularly such as MDA, GSH, SOD, GPx and CAT etc. There is a balance between these oxidant and antioxidant molecules for homeostasis. Although stress gives an increase in oxidants, oxidation lead to decrease in antioxidants. However, to generate the metabolism in that situation, antioxidants are produced and oxidative damage is repaired.<sup>30,31</sup>

Our results showed that oxidant and antioxidant balance of broiler were affected by LED light colors (Figure 1). Animals exposed under red light had the higher MDA value, which can be a stress marker, compared to group control ( $p < 0.0001$ ) although there was no differences were found among groups GL and BL ( $p > 0.05$ ). This result may be due to the red light improvement effect on cellular oxidative activity. Similarly, it was reported that red light had a stress effect such as cannibalism in hens.<sup>32</sup>

Several studies suggested that monochromatic colors, green and blue have positive effect on growth and welfare against to stress especially in poultry management.<sup>7,10</sup> In the present study, the antioxidant enzymes values were increased in groups GL and BL compared to group Control statistically ( $p < 0.05$ ). Animals reared under green light (group GL) had the highest SOD ( $150.61 \pm 9.14$ ), CAT ( $4.18 \pm 0.17$ ) and GPx ( $186.96 \pm 10.50$ ) values compared to group Control and BL (Fig 1b-1c-1d;  $p < 0.05$ ). These increases of antioxidative enzymes may be explained by oxidative defense mechanism which occurs with cellular protein expression. Abdo et al.<sup>13</sup> determined that blue light could maintain the mRNA expression, and thereby proteins known as SOD, CAT and GPx1, which are important in oxidative antioxidative balance were increased. There are some reports about the efficiency of green and blue light on bird's growth.<sup>10,33</sup> Those studies, it was indicated

that although blue light induces the growth in old age of birds, green light stimulates the growth in youngers. Woodard et al.<sup>34</sup> also reported that green and blue light has the positive effect in Japanese quails. Monochromatic colors have been important for poultry management, especially green and blue. The obtained results suggest that either green or blue light has the best result for antioxidative balance of organism and maintain welfare. Thereby, green and blue light colors may be the sources for lightening process in poultry management. Furthermore, it can be said that green and blue light might be the best colors replace to others in broiler production.

## References

1. Er D, Wang Z, Cao J, et al. Effect of monochromatic light on the egg quality of laying hens. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2007;16(4):605-612.
2. North M, Bell DD. Lighting management in: *Chicken Production Manual*. 1990;407-431.
3. Prescott, NB, Wathes CM. Spectral sensitivity of the domestic fowl (*Gallus g. Domesticus*). *Br Poult Sci*. 1999;40: 332-339.
4. Hart NS. Variations in cone photoreceptor abundance and the visual ecology of birds. *Journal of Comparative Physiology A*. 2001;187: 685-97.
5. Olanrewaju HA, Thaxton JP, Dozier WA, et al. A review of lighting programmes for broiler production. *Int J Poult Sci*. 2006; 5(4):301-308.
6. Nicholls TJ, Goldsmith AR, Dawson A. Photorefractoriness in birds and comparison with mammals. *Physiological Reviews*. 1998;68, 133-176.
7. Hesham MH, Shereen A-H El, Enas SN. Impact of different light colours in behavior, welfare parameters and growth performance of Fayoumi broiler chickens strain. *J Hell Vet Med Soc*. 2018; 69(2):951-958.
8. Khaliq T, Khan AA, Dar PA, et al. Behavioral study of broilers reared under different colours of light in the evening hours. *J Entomol Zool Stud*. 2018; 6(4):1624-1627.
9. Rozenboim I, Robinzon B, Rosenstrauch A. Effect of light source and regimen on growing broilers. *Br Poult Sci*. 1999; 40(4):452-457
10. Rozenboim I, Chaiseha Y, Rosenstrauch A. The effect of a green and blue monochromatic light combination on broiler growth and development. *Poult Sci*. 2004; 83(5):842-845.
11. Xie D, Wang ZX, Dong YL et al. 2008. Effects of monochromatic light on immune response of broilers. *Poult Sci*. 2008; 87(8): 1535-1539.
12. Ke YY, Liu WJ, Wang ZX, et al. Effects of monochromatic light on quality properties and antioxidation of meat in broilers. *Poultry Science*. 2011;90(11): 2632-2637.
13. Abdo SE, El-Kassas S, El-Nahas AF, et al. Modulatory Effect of Monochromatic Blue Light on Heat Stress Response in Commercial Broilers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 1-13.
14. Tanno S, Yamamoto K, Kurata Y, Adachi M, Inoue Y, Otani N, Mishima M, Yamamoto Y, Kuwabara M, Ogino K, Miake J, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Okada F, Yamamoto K, Hisatome I. Protective Effects of Topiroxostat on an Ischemia-Reperfusion Model of Rat Hearts. *Circulation Journal*. 2018; 82:1101-1111.
15. Abdel-Rahman HA, Shawky SM, Ouda H, Nafeaa AA, Orabi SH. Effect of two probiotics and bioflavonoids supplementation to the broilers diet and drinking water on the growth performance and hepatic antioxidant parameters. *Global Veterinaria*. 2013; 10:734-741.
16. Fellenberg A, Speisky HC. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal*. 2006; 62(1):53-70.
17. Iskender H, Yenice G, Dokumacioglu E, Kaynar O, Hayirli A, Kaya A. The Effects of Dietary Flavonoid Supplementation on the Antioxidant Status of Laying Hens. *Brailian Journal of Poultry Science*. 2016; 18(4): 663-668.
18. Akbarian A, Michiels J, Degroote J, Majdeddin M, Golian A, De Smet S. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *J Anim Sci Biotechnol*. 2016; 28:7-37
19. Firat O, Cogun H, Yuzeroglu T, Gok G, Kargin F, Kotemen Y. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2011; 37:657-666.
20. Bashandy SAE, El Andan SA, Ebaaid H, Alhazza IM. Antioxidant Potential of *Spirulina platensis* Mitigates Oxidative Stress and Reprotoxicity Induced by Sodium Arsenite in Male Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016:1-8.
21. Keshavamurthy SR, Shiva Kumar Manohar CB, Sharadamma KC. Effect Of Antioxidant Formulation Supplementation Through Water on Antioxidant Status of Broiler Chicken. *International Journal of Advanced Biological Research*. 2013; 3(3):470-474.
22. Pan J, Yang Y, Yang B, et al. Artificial Polychromatic Light Affects Growth and Physiology in Chicks. *PLoS One*. 2014;9: e113595.



23. Yang Y, Jin SF, Zhong ZT, et al. 2015. Growth responses of broiler chickens to different periods of artificial light. *J Anim Sci.* 2015; 2: 767-775.
24. Nelson RJ, Blom JMC. Photoperiodic effects on tumor development and immune function. *J. Biol. Rhythms.* 1994; 9:233–249.
25. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;135: 372-376.
26. Dowdy S, Wearden S. *Statistics for Research.* John Wiley&Sons Press, New York; 1981.
27. Dawson B, Trapp RG. *Basic&Clinical Biostatistics.* 3rd ed. Lange Medical Books / McGraw International Editions, New York; 2001.
28. El Halawani, ME. Light spectrum requirement for maximizing breeder hen turkey egg production. *Gobles.* 2013; 70(4):6-8.
29. Huber-Eicher B, Suter A., Spring-Stahli P. Effects of colored light-emitting diode illumination on behavior and performance of laying hens. *Poultry Science.* 2013; 92:869-873.
30. Halliwell BH, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th ed. Oxford University Press, Oxford; 2007.
31. Nur G, Devenci HA. Histopathological and biochemical responses to the oxidative stress induced by glyphosate-based herbicides in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Cell Neurosci Oxid Stress.* 2018; 10(1):656-665.
32. Bowlby GMS. Some preliminary investigations into the effect of light on broilers. *World's Poult. Sci. J.* 1957;13:214–226.
33. Halevy O , Biran I, Rozenboim I. Various light source treatments affect body and skeletal muscle growth by affecting skeletal muscle satellite cell proliferation in broilers. *Comp. Physiol. Biochem.* 1998; 120:317-323.
34. Woodard AE, Moore JA, Wilson WO. Effect of wave length of light on growth and reproduction in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poult Sci.* 1969; 48:118-123.



# Diyarbakır İlinde Yetiştirilen Ruminantlarda Solunum Sistemi Viruslarının Seroprevalansı ve Pestivirus Varlığının Araştırılması

<sup>ORCID</sup> Berfin KADİROĞLU<sup>1</sup>, <sup>ORCID</sup> Gizem AYTOĞU<sup>1</sup>, <sup>ORCID</sup> Kadir YEŞİLBAĞ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD, Bursa-Türkiye

Received 2019-05-02 Accepted 2020-04-17

## Özet

Sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) başta sığırlar olmak üzere birçok çift turnaklı hayvan türünü etkileyen ve ülkemiz dahil olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak görülen bir problemdir. Bu çalışmada Diyarbakır ilini temsil edecek şekilde 8 farklı ilçeden 229 sığır, 192 koyun ve 12 keçi olmak üzere toplam 433 serum örneğinde Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine coronavirus (BCoV) ve Bovine parainfluenza-3 (BPIV-3) viruslarına karşı gelişmiş antikorların varlığı incelenmiştir. Virus nötralizasyon yöntemiyle belirlenen seroprevalans değerleri BVDV, BHV-1, BRSV, BCoV ve BPIV-3 virusları yönünden sırasıyla sığırlarda %57,6, %37,6, %71,2, %75,5, %40,2; koyunlarda %39,6, %1,6, %79,7, %86,5, %16,7; ve keçilerde %66,7, %50, %100, %100, %8,3 olarak bulunmuştur. Aynı örneklem grubundan 39 sığır, 11 keçi ve 33 koyuna ait örnekler RT-PCR yöntemiyle incelenmiş ve pestivirus yönünden negatif bulunmuştur. Test edilen virusların seroprevalans değerleri arasında istatistiki olarak yüksek oranda farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). Diyarbakır ilinde örneklenen tüm hayvanlarda BCoV ve BRSV seroprevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple BCoV ve BRSV enfeksiyonlarının bu bölgede sadece sığırlarda değil aynı zamanda koyun ve keçilerde de BRDC enfeksiyonlarına yakınlık oluşturabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Viral enfeksiyonlar, Ruminant, Seroprevalans, Virus nötralizasyon, RT-PCR, Diyarbakır

## Abstract

The bovine respiratory system complex (BRDC) is a viral disease that affects many ungulates, especially cattle, and is common worldwide. Total of 433 sera (229 cattle, 192 sheep and 12 goats serum) were collected from eight district of Diyarbakır province, South Eastern Turkey. Serological analysis by serum neutralisation assay were performed against Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine coronavirus (BCoV), and Bovine parainfluenza-3 (BPIV-3) viruses. Detected seroprevalence rates against BVDV, BHV-1, BRSV, BCoV and BPIV-3 were 57.6%, 37.6%, 71.2%, 75.5%, 40.2% in cattle; 39.6%, 1.6%, 79.7%, 86.5%, 16.7% in sheep and 66.7%, 50%, 100%, 100%, 8.3% in goats, respectively. Selected samples from 39 cattle, 11 goats and 33 sheep were negative for pestivirus by RT-PCR. A statistically significant difference was detected among seroprevalence values of tested viruses ( $p < 0.001$ ). Due to the high seroprevalence of BCoV and BRSV in all tested animals species, those viruses may be concluded as possible reason for tendency to BRDC infections not only in cattle but also in sheep and goats in the region.

Key Words: Viral infections, Ruminants, Seroprevalance, Virus neutralization, RT-PCR, Diyarbakır

## Giriş

Solunum sistemi enfeksiyonları çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde mortalite, gelişme geriliği, verim kaybı,

karkas kalitesi ve karkas ağırlığında azalma gibi önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.<sup>1</sup> Sığırların solunum sistemi hastalık kompleksi (BRDC) birçok enfeksiyöz ajanın rol aldığı multi-etiyolojik bir hastalık tablosu olarak

\* Corresponding author: Kadir YEŞİLBAĞ: Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD, Bursa-Türkiye.

Tel: (+90 224) 294 12 95, e-mail: kyesilbag@uludag.edu.tr



nitelendirilir. BRDC gelişimine katkı sağlayan *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* ve *Mycoplasma bovis* gibi bakteriyel etkenlerin yanında, başta Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine parainfluenzavirus-3 (BPIV-3) ve Bovine coronavirus (BCoV) olmak üzere birçok viral etken ile söz konusu virus ve bakteriler BRDC klinik olgularında değişen kombinasyonlarda çoklu enfeksiyon şeklinde ortaya çıkar.<sup>2-4</sup> Bu etkenler aynı zamanda koyun ve keçilerde de benzer enfeksiyon tablosuna neden olmaktadır.<sup>5</sup>

BVDV, yakın antijenik özellik gösteren koyun ve keçilerin Sınır hastalığı virusu (Border disease virus -BDV) ve Klasik domuz vebası virusu (CSFV) ile birlikte Flaviviridae ailesinde Pestivirus cinsinde yer almaktadır. Pestivirus enfeksiyonlarının klinik ve patolojik bulguları virus türüne, biyotipine, konakçının gebelik periyoduna, immünolojik durumuna ve çevresel faktörlere göre değişmektedir. Non-sitopatojen BVDV suşuyla transplasental enfeksiyonlarda fetüsün immunokompedans gelişmeden önce virusla karşılaşması halinde immunotolere persiste enfeksiyon meydana gelmektedir.<sup>6</sup> Hastalığın çoklu klinik form, patogenezi ve bulguları arasında ölümcül karakterdeki mukoza hastalığı (MD), konjenital anomali, reproduktif kayıplar, değişen derecelerde ateş, ishal, lökopeni, eroziv stomatit, nazal ve oküler akıntı sayılabilir. Aynı zamanda virusun immun supresif etkisi sonucunda sekonder enfeksiyonlara duyarlılığın arttığı, bu sebeple virusun solunum sistemi enfeksiyonlarının oluşumunda önemli rolü olduğu da bildirilmiştir.<sup>7</sup>

BoHV-1 Herpesviridae ailesinde, Alfaherpesvirinae alt ailesindeki Varicellovirus cinsinde yer almaktadır. BoHV-1 enfeksiyonlarında üst solunum yolu ve genital sistem etkilenerek mukopurulent nazal akıntı, konjunktivit, püstüller vulvovajinit ve balanopostit meydana gelebilir. Akut enfeksiyonu takiben trigeminal ve sakral ganglionlarda latent kalan virusun immunosupresyon ve stres faktörleriyle reaktif olduğu tespit edilmiştir.<sup>8</sup> En önemli konakçısı sığırlar olmakla beraber koyun ve keçilerde de BoHV-1 enfeksiyonları tespit edilmiştir. Bu sebeple sığırlarda enfeksiyon gelişmesinde türler arası virus saçılımının etkili olabileceği ve küçük ruminantların muhtemel virus kaynağı oldukları öne sürülmüştür.<sup>9</sup>

Pneumoviridae ailesi Orthopneumovirus cinsinde yer alan BRSV sığırlarla birlikte koyun ve keçileri de enfekte edebilmektedir.<sup>10</sup> Hastalık görünümü ölümcül formdan subklinik seyre kadar değişkenlik göstermektedir. Sığırlarda subklinik seyreden hastalık 5 aylıktan küçük buzağılarda

şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olmaktadır.<sup>11</sup> BRSV'nin, oluşturduğu hastalık bulguları dışında immun sistemi baskılayarak konakçıyı sekonder enfeksiyonlara duyarlı hale getirmesi sebebiyle solunum sistemi enfeksiyonlarında önemli rolü olduğu bilinmektedir.

BPIV-3, Paramyxoviridae ailesinde Respirovirus cinsinde yer almaktadır.<sup>12</sup> Tek başına hafif seyirli enfeksiyon oluşturan virus, alveolar epitel ve makrofajların yanı sıra üst ve alt solunum yollarındaki siliyer solunum epitel hücrelerini de enfekte etmektedir. Etken sığırlarda görülmekle birlikte, tüm dünyada koyun ve keçilerin solunum yollarında sık rastlanan viral etkenlerden biridir. Koyun ve keçilerde pnömoni gelişimine sebep olabileceği gibi, klinik bulgu göstermeyen küçük ruminantlarda değişen oranlarda sero-prevalans değerleri de saptanmıştır.<sup>5,13</sup>

BCoV, Coronaviridae ailesinde Coronavirinae alt ailesinde Betacoronavirus genusunda yer almaktadır. Bovine-like CoV'ler vahşi ruminantların yanı sıra ishali koyun dışkısında da tespit edilmiştir. BCoV sığırlarda neonatal ishal, kış dizanterisi ve solunum yolu enfeksiyonlarından sorumludur.<sup>14-15</sup> Erken yaşta enteritis, depresyon, zayıflık ve gelişen neonatal ishale bağlı olarak sürüde ekonomik kayıplara yol açan coronavirus, neonatal ishali oğlaklarda da tespit edilmiştir.<sup>16</sup> Serolojik çalışmalar bovine coronavirusun sığır dışında koyun ve keçilerde de sirküle olduğunu göstermektedir.<sup>17-19</sup>

Ülkemizde BRDC etiolojisinde rol alan virusların varlığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ve özellikle Diyarbakır ilinde söz konusu virusların tamamına yönelik sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Bu çalışmada ruminant yetiştiriciliği yönünden öneme sahip olan bölgede BRDC etiolojisindeki viral etkenlerin serolojik durumunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca Güneydoğu Anadolu bölgesinde pestiviruslara yönelik çalışmaların ağırlıklı olarak serolojik yönde olması ve ilgili çalışmalarda yüksek seroprevalans değerlerinin belirlenmiş olması sebebiyle seçilen örneklerde pestivirus taraması yapılarak saptanması olası saha suşlarının moleküler tiplendirmesi de hedeflenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Örneklenen hayvanlar

Örnekleme çalışmaları Diyarbakır ilinde yer alan Hani, Silvan, Eğil, Dicle, Sur, Yenişehir, Kayapınar ve Bağlar olmak üzere toplam 8 ilçede yapıldı. Saha koşullarını yansıtmaya amacıyla halk elinde bulunan küçük işletmelerde barındırılan ve tamamı 6 ay-5 yaş aralığında olan sığır, koyun ve keçilerden rastgele yapılan örnekleme değerlendirildi.

Örnekleme yapılan işletmelerde tek tür hayvan bulunduğu fakat ortak mera kullanıldığı yetiştiriciler tarafından beyan edildi. Örnekleme yapılan sürülerin aile işletmesi yapısında olduğu ve hayvan sayısının 5-25 baş arasında değiştiği kaydedildi. Örnekleme sürecinde (UÜ-HADYEK 2017-11-3) klinik bulgu, ırk ve cinsiyet farkı gözlemlenmedi. Değerlendirilen sığırların önemli bir bölümünde örnekleme anında klinik bulgu tespit edilmezken, 17 sığırdan ve koyunların tamamında hafif solunum ve/veya sindirim sistemi bulguları görülmüş olduğu bildirildi. Araştırma kapsamında incelenen virüslere karşı aşılama yapılmamış olan 18 sürüden 229 sığır, 192 koyun ve 12 keçi olmak üzere toplam 433 hayvandan kan örneği kullanıldı. Sığır ve koyun örnek sayılarına kıyasla keçi sayısının oldukça az olması, barınaklardan sadece 2 tanesinde keçi yetiştiriciliği yapılırken diğerlerinde bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Antikoagülsüz tüplere alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara nakledildi. Santrifüjleme işlemiyle (3000 x rpm'de 10 dk) çıkarılan serum ayrılarak 56°C'de 30 dk süreyle inaktive edildi ve test aşamasına kadar  $\leq -20$  °C'de saklandı. Yeterli miktara sahip olan örnekler arasından 39 sığır, 33 koyun ve 11 keçi serumundan 0.5 ml ayrılarak RT-PCR'la pestivirus taramasında kullanılmak üzere inaktive edilmeden saklandı.

### Hücre Kültürü ve Virüsler

Araştırmada kullanılan virüslerin üretilmesi, titrasyonu ve test aşamalarında Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürünün intrinsik pesti-virus enfeksiyonu yönünden ari olduğunun teyidi immunoperoksidaz testi ve RT-PCR yöntemiyle yapıldı.<sup>20</sup> Virus nötralizasyon testlerinde test virüsü olarak tamamı sito-patolojik etki (CPE) oluşturarak üreyen BVDV NADL, BoHV-1 Cooper, BRSV Atue, BPIV-3 SF-4 ve BCoV Me-bus referans suşları kullanıldı. Virüslerin titreleri 10 katlı sulandırılmalar yapılarak standart mikrotitrasyon yöntemiyle belirlendi. Hücre hatlarının üretilmesi için pestivirus kontaminasyonu bakımından negatif olduğu önceden belirlenen fetal dana serumu (%10) eklenmiş DMEM vasatı (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanıldı.

### Virus nötralizasyon testi

Araştırma kapsamında antikor tespiti amacıyla mikronötralizasyon yöntemi kullanıldı.<sup>21</sup> Her serum örneği için 2 göz olacak şekilde 50 µl dağıtıldı. Titresi belirlenen virus süspansiyonundan her göze 50 µl dağıtılıp BVDV, BRSV, BCoV ve PI-3 için 1 saat, BoHV-1 için ise 2 saat süreyle 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Ardından tüm gözlerle 300.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış MDBK hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Tekrar aynı koşullarda inkübasyona bırakılan pleyt gözlerindeki hücreler 5-7 gün süreyle invert mikroskop altında incelenerek CPE oluşumları yönünden değerlendirildi. CPE oluşumunun görülmediği örnekler antikor pozitif olarak değerlendirildi.

### RNA izolasyonu ve RT-PCR Analizi

Seçilen örneklerde BVDV taraması amacıyla pan-pesti-virus spesifik primerler kullanılarak RT-PCR uygulandı. Bu amaçla inaktive edilmemiş serum örneklerinden vi-ral RNA ekstraksiyon kiti (NucleoSpin® Virus, Macherey-Nagel, Germany) kullanılarak nükleik asit izolasyonu gerçekleştirildi ve ticari kit (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-rad, USA) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Pan-pesti-virus varlığını araştırmak amacıyla p324 (5'-ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA-3') ve p326 (5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3') primerlerinin kullanıldığı RT-PCR protokolü uygulandı.<sup>22</sup> Buna göre; 94°C'de 2 dk ön ısıtmayı takiben 35 siklus olacak şekilde 94°C'de 1 dk denatürasyon, 56°C'de 1 dk bağlanma, 72°C 1 dk uzama ve son aşamada 72°C'de 7 dk son uzama işlemleri uygulandı. 288 bp uzunluğundaki PCR ürünleri SafeView™ (Applied Biological Materials, Canada) ilave edilen %2'lik agaroz jelde elektroforez uygulanarak görüntüledi.

### İstatistiksel analizler

Araştırma kapsamında incelenen 5 virusa karşı elde edilen seroprevalans değerleri, hayvan türlerine göre dağılımı ve çoklu enfeksiyon verileri SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 23) programında Ki kare testiyle analiz edildi.

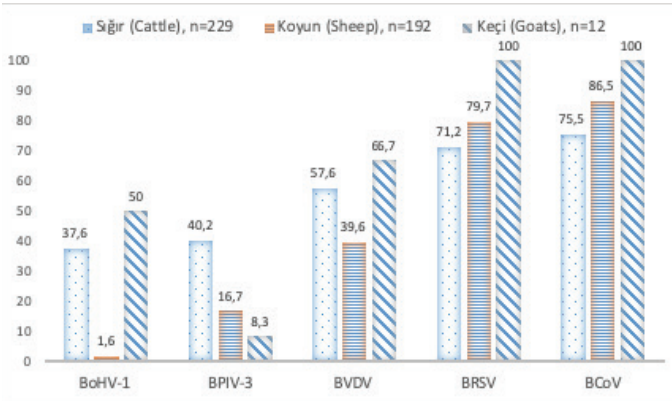
### Bulgular

Test edilen 433 hayvanda BVDV, BoHV-1, BRSV, BPIV-3 ve BCoV etkenlerine karşı seroprevalans değerlerine hayvan türüne göre bakıldığında sığır, koyun ve keçiler arasında istatistiki olarak önemli düzeyde fark olduğu bulundu ( $p < 0,001$ ). Tüm hayvan türlerinde en yüksek seropozitiflik oranı BCoV'e karşı saptandı (Tablo 1). Buna göre sığır, koyun ve keçilerde BCoV' a karşı seropozitiflik oranları sırasıyla %75,5, %86,5 ve %100 olarak tespit edildi (Şekil 1). BRSV'a karşı seropozitiflik değerlerinin de yüksek oranlarda seyrettiği tespit edildi (Tablo 1). Hayvan türlerine göre BRSV ve BCoV seroprevalans değerleri arasında istatistiki farklılık olmadığı görüldü ( $p \leq 0,058$ ). En düşük seroprevalans değerleri BoHV-1'e karşı saptanırken, hayvan türleri açısından en düşük seropozitiflik oranı koyunlarda (%1,6) tespit edildi (Şekil 1). Keçilerin tamamında BRSV ve BCoV' a karşı seropozitiflik görülürken (%100,0), BPIV-3 virüsüne karşı antikor varlığı sadece bir keçide tespit edildi.

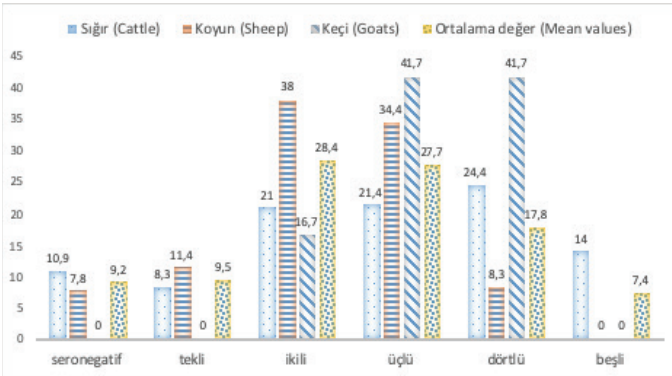
Tablo 1: Araştırılan virusların lokasyonlara göre seroprevalans değerleri

Lokasyon	Hayvan Sayısı (n)			Seropozitiflik Oranı (n, %)														
	S	Ky	Kç	BoHV-1			BPIV-3			BVDV			BRSV			BCoV		
				S	Ky	Kç	S	Ky	Kç	S	Ky	Kç	S	Ky	Kç	S	Ky	Kç
Bağlar	29	69	1	8 (%27,5)	3 (%4,3)	-	9 (%31,0)	5 (%7,2)	-	10 (%34,4)	42 (%60,8)	-	20 (%68,9)	64 (%92,7)	1 (%100)	18 (%62,0)	67 (%97,1)	1 (%100)
Yenişehir	26	-	-	11 (%42,3)	-	-	7 (%26,9)	-	-	13 (%50,0)	-	-	17 (%65,3)	-	-	15 (%57,6)	-	-
Kayapınar	30	-	-	17 (%56,6)	-	-	15 (%50,0)	-	-	14 (%46,6)	-	-	21 (%70,0)	-	-	15 (%50)	-	-
Sur	48	123	-	25 (%52,0)	-	-	26 (%54,1)	26 (%21,1)	-	35 (%72,9)	34 (%27,6)	-	38 (%79,1)	89 (%72,3)	-	41 (%85,4)	99 (%80,4)	-
Silvan	4	-	-	3 (%75)	-	-	2 (%50)	-	-	2 (%50)	-	-	4 (%100)	-	-	4 (%100)	-	-
Eğil	4	-	-	1 (%25)	-	-	2 (%50)	-	-	0	-	-	3 (%75)	-	-	4 (%100)	-	-
Dicle	18	-	-	3 (%16,6)	-	-	7 (%38,8)	-	-	14 (%77,7)	-	-	13 (%72,2)	-	-	16 (%88,9)	-	-
Hani	70	-	11	21 (%30)	-	6 (%54,5)	26 (%37,1)	-	1 (%9,0)	47 (%67,1)	-	8 (%72,7)	50 (%71,4)	-	11 (%100)	64 (%91,4)	-	11 (%100)
Toplam hayvan sayısı	229	192	12	86 (%37,5)	3 (%1,6)	6 (%50)	93 (%40,6)	31 (%16,1)	1 (%8,3)	132 (%57,6)	76 (%39,6)	8 (%66,7)	163 (%71,2)	153 (%79,7)	12 (%100)	173 (%75,5)	166 (%86,4)	12 (%100)
Genel toplam hayvan sayısı	433			95 (%21,9)			125 (%28,9)			216 (%49,9)			328 (%75,8)			351 (%81,1)		

(-): Belirtilen hayvan türü ve lokasyondan örnekleme yapılmamıştır; S: Sığır; Ky: Koyun; Kç: Keçi



Şekil 1: Test viruslarına göre belirlenen seroprevalans değerleri (%)



Şekil 2: Hayvan türlerine göre çoklu enfeksiyonların dağılımı (n: 433, %)

Tekli ve çoklu seropozitifliklerin değerlendirilmesiyle istatistiki olarak önemli farklılıklar tespit edildi ( $p < 0,001$ ). Çoklu seropozitiflik değerlerinde en yüksek olarak ikili ve

üçlü pozitiflik kombinasyonu (sırasıyla %28,4 ve %27,7) belirlendi. Tüm hayvanlarda ikili seropozitiflik kombinasyonu ele alındığında en yüksek seropozitiflik oranı BCoV-BRSV kombinasyonunda bulundu (%66,6). Benzer olarak üçlü kombinasyonlarda BCoV-BRSV-BVDV kombinasyonlarının en yüksek orana sahip olduğu belirlendi (%63,3). Koyun ve keçilerde beşli seropozitiflik kombinasyonu görülmezken, sığırlarda bu oran %13,9 düzeyinde bulundu. Araştırma sonunda toplam 40 (%9,2) hayvanda araştırma kapsamında değerlendirilen 5 virustan hiçbirine karşı antikor tespit edilemedi. Sığır, koyun ve keçilerde seronegatif oranlar sırasıyla %10,9, %7,8 ve %0 olarak bulundu. İnaktive edilmemiş olan 83 örneğin panpestivirus primerleriyle yapılan RT-PCR uygulamasında ise tüm örnekler pestivirus yönünden negatif sonuç vermiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) sığırlarda önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olabilen bir hastalıktır. BRDC gelişimine katkı sağlayan virusların koyun ve keçilerdeki solunum sistemi hastalıklarında da rol aldığı bilinmektedir. Ülkemizde BRDC enfeksiyonları yaygın olup hayvan sağlığı ve ekonomik açıdan önemi birçok çalışmada vurgulanmıştır.<sup>23-26</sup>

Sığırlarda BVDV enfeksiyonu dünya genelinde yaygın olup, ülkemizde ruminantlardaki seropozitiflik oranları %1,8-%96,6 arasında saptanmıştır.<sup>3,27-31</sup> Güneydoğu Anadolu bölgesindeki illerde yapılan çalışmalarda Şan-



lurfa'daki sığırlarlarda BVDV seroprevalansı %96,6 olarak belirlenmiştir.<sup>3</sup> Çabalar ve ark.<sup>29</sup> tarafından BVDV seroprevalansı Şanlıurfa'da %71,0, Gaziantep'te %40-66,0, Diyarbakır'da %92,8-100 düzeyinde bildirilmiştir. Bölgenin büyük bölümünü temsilen değerlendirilen sığır örneklerinde ise BVDV seroprevalansı %48,05 olarak belirlenmiştir.<sup>31</sup> Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesindeki keçilerde aborta neden olan etkenlerin serolojik olarak incelendiği bir çalışmada BVDV için seroprevalans değeri %30,2 olarak gösterilmiştir.<sup>28</sup> Araştırmamızda Diyarbakır ilinde BVD virusuna karşı sığır, koyun ve keçilerdeki seroprevalans değerleri sırasıyla %57,6 , %39,6 ve %66,7 (ortalama %49,9) olarak bulunmuş olup daha önce elde edilen değerlerle benzerlik göstermektedir. Ancak Pestivirus cinsindeki virusların antijenik yakınlığı ve tespit edilebilen çapraz reaksiyonlar göz önüne alındığında koyun ve keçilerde elde edilen seropozitiflik değerlerinin sadece BVD virusunun türler arası geçişinden kaynaklanmayabileceği, diğer pestivirusların (özellikle BDV) varlığından da ileri gelebileceği dikkate alınmalıdır. Diğer taraftan yüksek seroprevalans değerleri elde edilmiş olmasına karşın sığır, koyun ve keçi örneklerinde RT-PCR ile yapılan virolojik analizlerde pozitif sonuç bulunamamıştır. Bu durum örneklenen hayvanlar arasında persiste enfekte birey bulunmadığı ve örnekleme sırasında viremi safhasında akut enfeksiyon olmadığına işaret etmektedir. Bölgede yapılacak geniş kapsamlı saha çalışmalarıyla elde edilecek izolatların moleküler karakterizasyonunun yapılmasıyla ülkemizde BVDV'nin moleküler epidemiyolojisiyle ilgili bölgesel verilerin tamamlanabileceği değerlendirilmektedir.

BoHV-1 sığır, koyun ve keçilerde solunum ve genital enfeksiyonlara neden olup, immun sistemi baskılayarak hayvanları diğer enfeksiyonlara predispoze hale getirir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ruminantlar için seropozitiflik oranları %2,27 – 61,50<sup>13,32-36</sup> olarak bildirilmiştir. Diyarbakır bölgesinin incelendiği çalışmalarda sığırlar için antikör değerleri %47,7-79,0 arasında değişmektedir.<sup>31,37</sup> Bu çalışmada sığır, koyun ve keçiler için seroprevalans değerleri sırasıyla %37,6 , %1,6 ve %50,0 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerler Diyarbakır ilinde daha önce belirlenen seroprevalans değerlerinden daha düşüktür. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda keçilerin koyunlara oranla daha yüksek seropozitiflik göstermesi<sup>9,13,27</sup> tür direnci ihtimalini akla getirmektedir. Deneysel çalışmalarda BoHV-1 ve CapHV-1'in doğal konakçıları arasında çapraz enfeksiyon oluşturabildiğinin gösterilmesi yanında, ardından tüm gözlemlere 300.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış MDBK hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi.<sup>38</sup> Koyun ve keçilerde doğal BoHV-1 enfeksiyonu da tespit edilmiştir.<sup>9</sup> Bu bilgiler ışığında ülkemizdeki bazı işletmelerde koyun ve keçi gibi potansiyel rezervuar hayvanların sığırlarla

beraber barındırılmasının oluşturabileceği riskler göz ardı edilmemelidir.

BRDC'nin bir diğer önemli etkeni olan BRSV enfeksiyonu da dünyada yaygın olup, seroprevalansının %100'e ulaşabildiği gösterilmiştir.<sup>39</sup> Ülkemizde sığırlarda saptanan seropozitiflik değerleri %44,6–97,1 arasında değişmektedir.<sup>23,40-41</sup> Türkiye'nin batı bölgelerindeki koyun ve keçilerde BRSV seroprevalansı %50,9-%74,7 arasında saptanırken,<sup>13,27</sup> Güneydoğu Anadolu bölgesinde BRSV ile ilgili çalışmalar sınırlı olup, Çabalar ve ark.<sup>42</sup> tarafından sığırlardaki seropozitiflik oranı %67,3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada sığır, koyun ve keçilerden elde edilen sırasıyla %71,2 , %79,7 ve %100 seroprevalans değerleri, bölgede daha önce tespit edilen değerlerden daha yüksektir. Hayvanlar arasında BRSV bulaşmasının aerosoller yoluyla olması ve böylece hızlı yayılması yüksek seroprevalans değerlerinin sebebi olarak değerlendirilebilir.

BPIV-3 özellikle makrofajları enfekte ederek, immunsupresyona bağlı sekonder enfeksiyonları tetikleyebilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda sığırlarda BPIV-3 seropozitiflik oranlarının % 11,0-91,1 arasında değiştiği gösterilmiştir.<sup>17,23,27,35,40-43</sup> Koyun ve keçilerde ise % 3,3- %16,2 arasında değişen değerler bildirilmiştir.<sup>13,27,44-45</sup> Van ve Bitlis illerinde yapılan patolojik incelemelerde pnömonili keçilerin %66,6'sının akciğerlerinden BPIV-3 antijeni tespit edilmiştir.<sup>46</sup> Bu çalışmada Diyarbakır bölgesinden elde edilen serolojik bulgular önceki veriler ile uyumluluk göstermektedir. En yüksek seroprevalans değeri sığırlarda (%40,2) tespit edilirken, koyun ve keçilerde daha düşük değerler (%16,7, %8,3) saptanmıştır

BCoV sığırlarda solunum ve sindirim sisteminde enfeksiyona neden olarak hayvanlar arasında fekal-oral ve solunum yoluyla bulaştırılabilir.<sup>47</sup> BCoV'un sığır popülasyonlarında yüksek seropozitiflik düzeyleriyle (% 82-90) seyrettiği bilinmektedir.<sup>10,48</sup> BCoV'un sığırlar dışında, diyareli kuzu ve oğlakta tespit edilebildiği bildirilse de<sup>4,16</sup> özellikle küçük ruminantlarda solunum hastalıkları kompleksine katıldığını gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ülkemizde sığırlarda BCoV enfeksiyonlarının varlığı değişik yöntemlerle gösterilmiştir.<sup>15,17,49-52</sup> Sığırlarda BCoV seroprevalansı %4,4-100 arasında saptanırken,<sup>15,17,49,51-52</sup> Güneydoğu Anadolu bölgesini temsilen Şanlıurfa ilinden alınan örneklerde bu oran %13,3 olarak bulunmuştur.<sup>49</sup> Bu çalışmada Diyarbakır ilinde saptanan değerler oldukça yüksek olup sığır, koyun ve keçilerde sırasıyla %75,5 , %86,5 ve %100 düzeyindedir. Dünyada koyun ve keçilerde coronavirus tespiti ya da seroprevalansına yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.<sup>18-19</sup>



Yang ve ark.19 Güney Kore'de 804 keçideki seropozitiflik oranını %1 olarak saptamıştır. Trávén ve ark.<sup>18</sup> ise İsveç'te 218 koyundaki seropozitiflik oranını %19 olarak saptamıştır. Bu çalışmada koyunlarda seropozitiflik düzeyinin yüksek olduğu (%86,5) görülürken, test edilen keçilerin tamamında antikor saptanmıştır. Ancak örneklenen keçi sayısının oldukça düşük olması nedeniyle elde edilen verilerin bölgedeki durumu tam olarak yansıtmaya yeterli olmadığı ve daha geniş örnek popülasyonunun incelenmesi gerektiği değerlendirilmektedir. Diğer taraftan küçük ruminantlarda yüksek seroprevalans değerlerinin saptanmış olması bu hayvan türlerinde Coronavirus patogenezinin araştırılmasının gerekliliği konusunu gündeme getirmektedir.

Test edilen hayvanlardan 40 tanesi (%9,2) (25 sığır, 15 koyun) araştırmada ele alınan etkenler yönünden seronegatif olarak belirlenirken, 393 (%90,8) tanesinde antikor tespiti yapılmıştır. Bu durum Diyarbakır bölgesinde solunum sistemi viral enfeksiyonlarının yaygınlığına işaret etmektedir. Seropozitif olan hayvanlardan sadece 41 tanesinde (%9,5) tekli enfeksiyon saptanması ise bölgedeki çoklu viral enfeksiyonların yaygınlığını (%81,3) gösteren önemli bir veridir. Çoklu enfeksiyon olarak belirlenen olgular ko-enfeksiyon şeklinde gerçekleşmiş olabileceği gibi, farklı zamanlarda oluşan tekli enfeksiyonlarla oluşan antikor yanıtlarına da bağlı olabilir. Klinik vakalardan alınacak örneklerde yapılacak virolojik çalışmalar bölgede görülen eş zamanlı çoklu enfeksiyonlar hakkında etiyolojik veriler sunacaktır. Bu çalışmada elde edilen serolojik verilere göre en yüksek olarak ikili (%28,4) ve üçlü (%27,7) kombinasyonlar saptanmıştır. Bu kombinasyonlar arasında en sık karşılaşılanlar sırasıyla BRSV-BCoV ve BRSV-BCoV-BVDV seropozitifliği olarak belirlenmiştir. Araştırmada test edilen viruslara karşı aşılammış hayvanlar kullanılmıştır. Bu hayvanlar arasında yüksek seroprevalans değerlerinin saptanması söz konusu virusların bölgede geniş ölçekte sirküle olduğunu göstermektedir. Her üç hayvan türünde saptanan seroprevalans değerlerindeki farklılıkların, sürüde persiste enfekte hayvan varlığı, barındırılma koşulları, beslenme şekli, stres faktörleri ve hayvan giriş-çıkışı gibi faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir. Örneklenen hayvanların tür bazında ayrı barındırılmasına karşın ortak mera kullanıyor olması türler arasının enfeksiyon bulaştırılması açısından önem taşıdığı göz ardı edilemez. Bu araştırmada elde edilen temel veriler ışığında vakaların klinik gözlem ve virolojik çalışmalarla desteklenmesini içeren kapsamlı çalışmalar yapılması, bölgedeki solunum sistemi enfeksiyonlarının etiyolojisine ilişkin detaylı verileri ortaya çıkaracaktır.

## Teşekkür

Bu araştırmaya ilişkin çalışmaların bir bölümü Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: KUAP(V)-2018/6. Örnekleme çalışmalarındaki katkısı nedeniyle Vet.Hek. Nahit Saylak ve Vet.Hek. Günsel Kirman'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Griffin D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin Food Anim*, 13(3), 367-377, 1997.
2. Alkan F, Özkul A, Bilge-Dağalp S, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu TÇ, Akça Y, Burgu İ. Virological And Serological Studies On The Role Of PI-3 Virus, BRSV, BVDV And BHV-1 On Respiratory İnfections Of Cattle The Detection Of Etiological Agents By Direct Immunofluorescence Technique. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 107: 193-195, 2000.
3. Özkul A, Çabalar M, Bilge S, Akça Y, Burgu İ. Süt sığırcılığı işletmelerinde rastlanan IBR/IPV ve BVD virus enfeksiyonlarının. infertilite olgularındaki rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42(3), 381-387, 1995.
4. Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and Pasteurella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med A*, 216(10), 1599-1604, 2000.
5. Elazhary MA, Silim A, Dea S. Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec. *Am J Vet Res*, 45(8), 1660-1662, 1984.
6. Brock KV. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 31(2), 133-135, 2003.
7. Moerman A, Straver PJ, De Jong MCM, Quak J, Baanvinger T, Van Oirschot JT. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet Q*, 16(2), 115-119, 1994.
8. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev*, 8(2), 187-205, 2007.
9. Mahmoud MA, Ahmed SA. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in sheep and goats in Egypt. *Glob Vet*, 3(6), 472-479, 2009.
10. Bidokhti MRM, Trávén M, Fall N, Emanuelson U, Aalenius S. Reduced likelihood of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus infection on organic compared to conventional dairy farms. *Vet J*. 182(3):

- 436-440, 2009.
11. Baker JC, Velicer LF. Bovine respiratory syncytial virus vaccination: current status and future vaccine development. *Compend Contin Educ Vet*, 1991.
  12. Tiwari K, Cornish C, Gamble B, Thomas D, Sharma RN. Seroprevalence of bovine parainfluenza virus Type 3 (BPI-3V) in ruminants from Grenada. *Open J Vet Med*, 6(02), 23, 2016.
  13. Yeşilbağ K, Güngör B. Antibody prevalence against respiratory viruses in sheep and goats in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Pro*, 41(4), 421-425, 2009.
  14. Alekseev KP, Vlasova AN, Jung K, Hasöksüz M, Zhang X, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Spiro D, Saif LJ. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J Virol*, 82(24), 12422-12431, 2008.
  15. Hasöksüz M, Kayar A, Dodurka T, Ilgaz A. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronavirus in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Vet Hung*, 53(1), 137-146, 2005.
  16. Özmen Ö, Yukarı A, Haligür M, Şahinduran Ş. Observations and immunohistochemical detection of Coronavirus, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal diarrhoea in lambs and kids. *Schweiz Arch Tierh*, 148(7), 357-364, 2006.
  17. Gümüsova Okur S, Yazıcı Z, Albayrak H, Meral Y. Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhoea. *Medycyna Wet*, 63, 62-64, 2007.
  18. Tråvén M, Carlsson U, Lunden A, Larsson B. (1999). Serum antibodies to bovine coronavirus in Swedish sheep. *Acta Vet Scand*, 40(1), 69-74, 1999.
  19. Yang DK, Hwang IJ, Kim BH, Kweon CH, Lee KW, Kang MI, Lee CS, Cho KO. Serosurveillance of viral diseases in Korean native goats (*Capra hircus*). *J Vet Med Sci*, 70(9), 977-979, 2008.
  20. Yeşilbağ K, Förster C, Ozyiğit MO, Alpay G, Tuncer P, Thiel HJ, König M. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Veterinary microbiology*, 169(1-2), 42-49, 2014.
  21. Frey HR, Liess B. Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zbl Vet Med*, 18(1), 61-71, 1971.
  22. Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136(3-4), 309-323, 1994.
  23. Avcı O, Yavru S, Sevik M. Antibody prevalence against respiratory viruses in naturally infected cattle in Central Anatolia. *Eurasian J Vet Sci*, 30(2), 80-84, 2014.
  24. Çomaklı S, Sağlam YS, Timurkan MO. Comparative detection of bovine herpesvirus-1 using antigen ELISA, immunohistochemistry and immunofluorescence methods in cattle with pneumonia. *Turk J Vet Anim Sci*, 43, 306-313, 2019.
  25. Gümüsova S, Yazıcı Z, Albayrak H. Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases, *Acta Vet*, 57:11-16, 2007.
  26. Timurkan MO, Aydın H, Sait A. Identification and molecular characterisation of bovine parainfluenza virus-3 and bovine respiratory syncytial virus: first report from Turkey. *J Vet Res*, 63 (2) 167-173; 2019.
  27. Alpay G, Tuncer P, Yeşilbağ K. Bir ada ekosistemindeki sığır, koyun ve keçilerde bazı viral enfeksiyonların serolojik olarak araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 43-48, 2014.
  28. Ataseven VS, Ataseven L, Tan T, Babur C, Oğuzoğlu TC. Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Rev Med Vet-Toulouse*, 157(11), 545, 2006.
  29. Çabalar M, Karaoğlu T. Sığırlarda bovine viral diarrhoea (BVD) Virus enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon immunoperoksidaz (NPLA) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 249-255, 1999.
  30. Ozan E, Turan HM, Albayrak H, Çavunt A. Serological determination of pestivirus, bluetongue virus and peste des petits ruminants virus in small ruminants in Samsun province of Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 7(1), 27-33, 2012.
  31. Özgünlük İ, Yıldırım Y. Güneydoğu Anadolu bölgesindeki sığırlarda bovine herpesvirus-1 (BHV-1) ve bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6(2), 152-157, 2017.
  32. Albayrak H, Yazıcı Z, Okur-Gümüsova S. Seroprevalence to bovine herpesvirus type 1 in sheep in Turkey. *Veterinarski arhiv*, 77(3), 257, 2007.
  33. Aslan ME, Azkur AK, Gazyağcı S. Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and *Brucella* spp. infections in cattle in Turkey. *J Vet Med Sci*, 77(11), 1371-1377, 2015.
  34. Tamer C, Palancı HS, Yazıcı Z, Bayram E, Çakmak M, Ozan E, Kadı H, Önkol Ş, Gümüsova S, Albayrak H. Serological data of bovine herpesvirus type-1 and

- bovine viral diarrhoea virus infections in various ruminants in small-scale farms in the Central and Eastern Black Sea Region, Turkey. *Indian J Anim Res*, 52(6), 903-906, 2018.
35. Yıldırım Y, Yılmaz V, Majarashin FRA. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi sınır illerinde bulunan sığırlarda viral solunum sistemi enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Kafkas Uni Vet Fak Derg*, 15(4), 601-606, 2009.
  36. Yılmaz V, Coşkun N. Investigation of bovine herpesvirus type-1 infection in sheep in the Kars Province of Turkey. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 5 (1) 40-43; 2016.
  37. Şimşek A, Gürcay M, Parmaksız A, Sekin S, Koçhan A, Çelik ÖY, Çakmak F. Diyarbakır Yöresindeki Sığırların Sindirim ve Solunum Sistemi Problemlerinde Enzootik Bovine Leukosis (EBL), Bovine Viral Diare (BVD), Infeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR) ve Mavi Dil (BT) Enfeksiyonlarının Rollerinin Araştırılması. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 10(1), 13-18, 2017.
  38. Six A, Banks M., Engels M., Ros Bascunana C. and Ackerman M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) in calves. *Arch Virol*, 146, 1325-1335, 2001.
  39. Sakhaee E, Khalili M. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran. *Iran J Vet Res*, 10(1), 49-53, 2009.
  40. Alkan F, Özkul A, Karaoğlu MT, Bilge S, Akça Y, Burgu D, Yeşilbağ K, Oğuzoğlu TC. Sığırlarda Viral Nedenli Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 44, 73-80, 1997.
  41. Öner EB, Yeşilbağ K. Besi sığırlarında solunum sistemi viruslarının seroprevalansı ve persiste BVD virus enfeksiyonu tespiti. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 65, 1-7, 2018
  42. Çabalar M, Can-Şahna K. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde süt sığırlarında parainfluenza virus-3, bovine herpesvirus-1 ve respiratory syncytial virus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 11(2), 101- 105, 2000.
  43. Yeşilbağ K, Güngör B. Seroprevalence of bovine respiratory virus in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Pro*, 40(1), 55-60, 2008.
  44. Ataseven VS, Başaran Z, Yılmaz V, Dağalp SB. Van bölgesi keçilerinde parainfluenza virus-3 (PIV-3) ve bovine herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonlarının seroprevalansı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 21(1), 7-9, 2010.
  45. Yavru S, Öztürk F, Gürhan İ, Şimşek A, Ünver G, Duman R, Yapıkçı O. Koyunlarda solunum yolu viruslarının serolojik olarak araştırılması. *Hayvancılık Araş Derg*, 53-60, 1999.
  46. Yener Z, Sağlam YS, Timurkaan N, İlhan F. Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *J Vet Med A*, 52(6), 268-271, 2005.
  47. Cho KO, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE, Saif LJ. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *Am J Vet Res*, 62(9), 1436-1441, 2001.
  48. O'Connor A, Martin SW, Nagy E, Menzies P, Harland R. The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to bovine coronavirus and bovine viral diarrhoea virus in 3 Ontario feedlots. *Can J Vet Res*. 65(3): 137-142, 2001.
  49. Alkan F, Bilge-Dağalp S, Can ŞK, Özgünlük İ. Sığırlarda coronavirus enfeksiyonunun epidemiyolojisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50(1), 59-64, 2003.
  50. Timurkan MO, Aydın H, Belen S. Erzurum Bölgesinde Sığırlarda Respiratory Coronavirus Enfeksiyonunun RT-PCR ile tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 10(3), 186-192; 2015.
  51. Yavru S, Yapıcı O, Kale M, Sahinduran S, Pehlivanoglu, F, Albay, MK, Avcı O. Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Sci Vet*, 44, 1-7, 2016.
  52. Yıldırım Y, Dağalp SB, Tan M, Kalaycıoğlu AT. Seroprevalence of the rotavirus and corona virus infections in cattle. *J Anim Vet Adv*, 7, 1320-1323, 2008.

## Türkiye’de Yarış Atlarında Tendinitis ile Etiyolojik Faktörler Arasındaki İlişki: Atlarla İlişkili Parametrelerin Etkisi

 G. Ülke ÇALIŞKAN<sup>1</sup>  Deniz SEYREK-İNTAŞ<sup>2</sup>  Nureddin ÇELİMLİ<sup>3</sup>

1Kastamonu Üniversitesi İhsangazi Meslek Yüksek Okulu Veterinerlik Bölüm Başkanlığı, 37250, Kastamonu/TÜRKİYE,  
2 Yakın Doğu Üniversitesi Hayvan Hastanesi Nicosia, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, Mersin 10/TÜRKİYE  
3Akademi Veteriner Polikliniği, Nilüfer-Bursa/TÜRKİYE

Received 2019-08-18 Accepted 2020-01-28

### Özet

Çalışmanın amacı, Türkiye’deki safkan İngiliz ve Arap ırkı yarış atlarında sıklıkla karşımıza çıkan tendinitis olgularında, atın bireysel yapısal özelliklerine ilişkin değerlendirmeler yapılarak, elde edilen bulguların prognostik önemlerinin ortaya konulmasıdır. Bu amaçla, metakarpal fleksor tendolarında tendinitis veya peritendinitis saptanan 118 safkan İngiliz (n=62, % 52,5) ve Arap (n=56, % 47,5) atlarına ait, toplam 120 olgu değerlendirildi. Anamnez alınmasını takiben, klinik olarak genel ve topallık tanısına yönelik özel muayeneler yapıldı. Ardından palmar metakarpal bölgeden ultrasonografik muayeneler yapılarak kesin tanı konuldu. İstatistikî değerlendirmelerde SPSS 13.0 programı kullanıldı. Olgulardan 102’sinde (% 85,0) tendinitis ve 18’inde (% 15,0) peritendinitis saptandı. Tendinitis ve peritendinitis olgularının yarış atlarının ırk, cinsiyet, yaş, cidago yüksekliği ile vücut ağırlığı özelliklerine göre dağılımları incelendi. Buna göre, çalışma materyalini oluşturan 118 attan 62’sinin (% 52,5) Safkan İngiliz, 56’sının (% 47,5) Safkan Arap ırkı olduğu tespit edildi. Bu atların 37’sinin (% 31,4) dişi, 81’inin (% 68,6) erkek olduğu belirlendi. Yaşlarına göre, 2-3 yaş arasında 48 at (% 40,7), 4-6 yaş arasında 62 at (% 52,5) ve 7 yaştan büyük olan toplam 8 at (% 6,8) olduğu belirlendi. Atlar vücut ağırlıklarına göre 400 kg’dan az olanlar (40/118, % 33,9), 401-450 kg arasında olanlar (39/118, % 33,1), 451-500 kg arasında olanlar (25/118, % 21,2), 501-550 kg arasında olanlar (13/118, % 11,0) ve 550 kg’dan fazla olanlar (1/118, % 0,8) şeklinde gruplandırıldı. Cidago yüksekliklerine göre 145-155 cm arasında olanlar (40/118, % 33,9), 156-165 cm arasında olanlar (66/118, % 55,9) ve 165 cm’den fazla olanlar (12/118, % 10,2) şeklinde üç grupta değerlendirildi. Bu faktörlerin tendinitis peritendinitis insidansında istatistiksel olarak önemli etkileri olup olmadığı değerlendirildi. Yapılan değerlendirmelerde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar ortaya çıkmamış olsa da, Türkiye koşullarında tendinitis geçiren safkan İngiliz ve Arap ırkı yarış atlarına ilişkin etiyolojik faktörler bakımından (ırk, yaş, cinsiyet, cidago ve vücut ağırlığı), elde edilen bulguların literatürle uyumlu olması dikkat çekici bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Tendinitis, İngiliz ve Arap yarış atı, Irk, Yaş, Cinsiyet, Cidago ve Vücut ağırlığı

### Abstract

The objective of this study was to determine the relationship between the individual structural characteristics of the horse and tendonitis in Thoroughbred and Arabian racehorses in Turkey and to display their prognostic relevance. In the study, a total of 120 cases were evaluated of 118 Thoroughbred (n=62, 52.5%) and Arabian (n=56, 47.5%) racehorses with tendonitis and peritendonitis on metacarpal flexor tendons. For this purpose, following taking the anamnesis, general clinical examinations and lameness examinations were done. After that, ultrasonography on palmar metacarpal flexor tendons and definitive diagnosis was made. SPSS 13.0 programme was used for statistical analysis. Tendonitis (n=102, 85.0 %) and peritendonitis (n=18, 15.0 %) were diagnosed in 120 cases. The distributions of tendonitis-peritendonitis cases according to breed, gender, age, height and body weight characteristics of racehorses were analyzed. According to this, it was determined from 118 racehorses that Thoroughbreds were 62 (52.5%), purebred Arabian racehorses were 56 (47.5%). Of these horses, 37 were detected as

\* Corresponding author: Dr. Öğr. Üyesi, Kastamonu Üniversitesi İhsangazi Meslek Yüksek Okulu Veterinerlik Bölüm Başkanlığı, 37250, Kastamonu/TÜRKİYE, E-posta: gucaliskan@kastamonu.edu.tr, Tel: +90 366 392 23 10-112 Belge geçer: +90 366 392 23 09  
Bu çalışma Dr. G. Ülke ÇALIŞKAN’ın doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.





mares (31.4%) and 81 were Stallions (68.6%). According to the ages, there were 48 horses (40.7%) between 2-3 years-old, 62 horses (52.5%) between 4-6 years-old and 8 horses (6.8%) older than 7 years-old. Horses were grouped according to the body weights as lighter than 400 kg (40/118, 33.9%), between 401-450 kg (39/118, 33.1%), between 451-500 kg (25/118, 21.2%), between 501-550 kg (13/118, 11.0%) and heavier than 550 kg (1/118, 0.8%). They were assessed in three groups according to their heights as between 145-155 cm (40/118, 33.9%), between 156- 165 cm (66/118, 55.9%) and longer than 165 cm (12/118, 10.2%). These parameters were analyzed whether to have any statistical significance on tendonitis-peritendonitis incidence. Although no statistically significant results were found in the assessments, in terms of etiological factors (race, age, gender, height and body weight) related to Thoroughbred and Arabian racehorses undergoing tendonitis in Turkey conditions, it was found remarkable that the findings were compatible with the literature.

Key Words: Tendonitis, Thoroughbred ve Arabian racehorses, Breed, Age, Gender, Height-Body weight

## GİRİŞ

Tendo hastalıklarının, spor atlarında performans düşüklüğüne, hatta spor hayatının sona ermesine sebep olan, en önemli problemlerden olduğu bilinmektedir.<sup>1-4</sup> Tendinitis, tendonun moleküler yapısında ve biyomekaniksel özelliklerinde kalıcı değişimlerle sonuçlanır. Zarar görmüş bir tendo uzun süre normal fonksiyonunu yapamadığı gibi<sup>3,4</sup> özellikle atletik performansa geri dönen atlarda 5 nüks de sık görülür.<sup>3,4,6,7</sup>

1994-1995 yılları arasında, Ankara ve İstanbul Atlı Spor Kulüplerine bağlı konkur müsabakalarına katılan, 220 at-tan 154'ünde belirlenen çeşitli lezyonların 79'unun, yani % 51'inin tendo, tendovagina ve bursa sinovyalis lezyonları olduğu bildirilmiştir.<sup>8</sup> Alkan ve arkadaşlarının<sup>9</sup>, toplam 102 yarış atında, topallık nedeni olan hastalıkları ele aldıkları bir değerlendirmede, topallıkların % 18,4 oranında tendo hastalıklarından kaynaklandığı ortaya konulmuştur. 2016-2018 yılları arasında Brezilya'daki yarış atlarındaki tendinopatilerin değerlendirildiği bir çalışmada, ortopedik lezyonlar içerisinde ikinci sırada olduğu vurgulanan tendinitis olguları insidansı % 25,6 (40/156) olarak bildirilmiştir.<sup>10</sup>

Tendinitisin oluşumunda rol oynayan hazırlayıcı sebeplerin başında; yapısal anomaliler (amudiyet bozuklukları vb), kötü zemin koşulları, nallama hataları, bilinçsiz ilaç kullanımı<sup>11</sup>, antrenman yetersizliği, binici hataları ve uzun mesafeli koşular yer almaktadır.<sup>6,7,12-15</sup> Tendinitisin yapıcı sebepleri ise fizyolojik tendo esnekliğini aşan şiddetli gerilmeler, tendo bölgesine isabet eden travmalar ve bazı kimyasal ajanlardır (kollajenaz gibi).<sup>6,13-16</sup> Günümüzde pek çok tendinitis nedeni biliniyor olsa da, safkan yarış atlarında görülen tendo lezyonları bakımından güncel epidemiyolojik çalışmalara hala ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü tendinitisin prevalansı yüksek ve sağaltım sürecinin uzun olması nedeniyle, muhtemel nedenlerinin belirlenmesi ve buna göre profilaktik ölçemler alınması önemlidir.<sup>12</sup>

Muskuloskeletal hasarlar, yarış endüstrisinde çok büyük

ekonomik kayıplara neden oldukları için pahalıya mal olurlar.<sup>17</sup> İngiliz yarış atlarının, Arap atlarına göre, hem muskuloskeletal yaralanmalar hem de tendinitis bakımından daha fazla risk altında olduğu bilinmektedir.<sup>18</sup> Diğer at ırklarının tendolarıyla kıyaslandığında, İngiliz yarış atları tendoları, gerilme limitinin üst sınırına daha yakın seviyede antrenman ve yarış temposuna maruz kalmaktadır.<sup>6</sup> Bu nedenle, galop sırasında yüksek bir risk altında olan tendo fibrillerinde, progresif hasarlanmalar şekillendiği bilinmektedir.<sup>4,16,19</sup> Arap atlarında tendinitis prevalansına ilişkin çalışma sayısı oldukça az olmakla birlikte; 2005-2012 yılları arasında Amerika'da yarışlara katılan Arap atlarının değerlendirildiği bir çalışmada, musculus fleksor digitalis superficialis (MFDS) tendinitis prevalansının % 19,0 (8/42), musculus interosseus medius'a ilişkin desmitis prevalansının ise % 7,1 (3/42) oranında tespit edildiği bildirilmiştir.<sup>20</sup>

Tendinitis insidansında, yaşlılığa bağlı olarak artış şekillendiği<sup>3,13,21</sup> ve bu durumun istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir.<sup>21</sup> Cinsiyet bakımından, aygırların kastre edilmiş erkeklerle ve dişilere oranla, tendinitis ve desmitis prevalanslarının fazla olduğu belirtilmiştir (p< 0,01).<sup>21</sup> Vücut ağırlığı bakımından değerlendirildiğinde, tendinitis şekillenen atlarda ortalama vücut ağırlığının daha fazla olması istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (p= 0,01).<sup>12</sup> Kalisiak'ın çalışmasında (2012), İngiliz yarış atlarındaki vücut ölçümlerinin tendinit prevalansı üzerindeki etkisi açıkça gösterilmişken, Arap yarış atlarında vücut ölçümlerinin tendinit prevalansı üzerinde istatistiksel açıdan önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.<sup>18</sup>

Türkiye koşullarında tendinitis geçiren atlara ilişkin etiyolojik faktörleri (ırk, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı, cidago) irdeleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, ülkemizdeki safkan İngiliz ve Arap yarış atlarında sıklıkla karşımıza çıkan tendinitis olgularında (metakarpal fleksor tendo lezyonlarında), atın bireysel yapısal özelliklerine ilişkin değerlendirmeler



yapılarak, elde edilen bulguların prognostik önemlerinin ortaya konulmasıdır.

## MATERYAL ve METOT

### Atlar

Çalışma materyali, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı'na tendo problemi şikâyeti bildirilen Bursa Osmangazi, İstanbul Veliefendi ve İzmir Şirinyer hipodromlarında yarışmakta veya yarış antrenmanında olan safkan İngiliz ve Arap atları arasından seçildi. Bu atlardan, ön ekstremite fleksor tendolarında tendinitis ya da peritendinitis geçirmiş veya geçirmekte olan 118 ata ait, toplam 120 olgu çalışmaya alındı.

### Ekipman

Çalışmada, ekipman olarak iki nokta arasındaki mesafe, çevre ve alan ölçümleri yapabilen bilgisayar programıyla desteklenmiş olan, 5-7,5 MHz'lik lineer ve 6-7,5 MHz'lik mikrokonveks problara sahip sabit bir ultrasonografi cihazı (Sonostar-Dynamic Imaging®, London, UK) ve aynı problemler ile kullanılabilen, taşınabilir özellikte ultrasonografi cihazı (MCV Concept-Dynamic Imaging® Co., London, UK) ve ara yastıklar kullanıldı.

### Anamnez, Klinik ve Ultrasonografik Muayene

Tendo problemi olduğu düşüncesiyle muayene talep edilen atlara ilişkin, at sahipleri veya antrenörlerinden atın geçmişi ve şikâyetleriyle ilgili detaylı bilgiler alındı.

Anamnez doğrultusunda, ön ekstremite fleksor tendolarında sakatlık olduğu düşünülen atlara, genel ve özel klinik muayene yapılarak etkilenen ekstremite ve tendo/tendolara ilişkin bulgular, hazırlanan tendo muayenesi formuna kaydedildi. Arka ekstremite tendolarına ilişkin lezyonlara, ön ekstremite tendoları lezyonlarına göre çok daha az oranda karşılaşıldı. Bu nedenle arka ekstremite tendolarına ilişkin sakatlanmalar bu çalışmaya dahil edilmedi.

Ön ekstremiteelerde metakarpal bölgenin palmar yüzünde, os carpi accessorium distal seviyesinden proksimal susam kemikleri hizasına kadar olan bölgede ultrasonografik muayene yapıldı. Muayene sırasında herhangi bir seda-tif ilaç uygulaması yapılmadı ve atın vücut ağırlığını dört ekstremiteye eşit olarak dağıtmasına dikkat edildi. Yüzlek yerleşim gösteren MFDS tendosunun detaylı değerlendirilebilmesi için, problemlere uygun ara yastıklar kullanıldı.

Ultrasonografik muayene bulguları, anamnez ve klinik muayene bulguları ile birlikte değerlendirilerek kesin tanı konuldu.

### Muayene Kayıtları

At sahiplerine veya antrenörlerine ilişkin kimlik ve iletişim bilgileri, hastanın adı, ırkı, yaşı, cinsiyeti, donu, cidago yüksekliği ve canlı ağırlığı gibi eşkal bilgileri alınan her bir at için ayrı bir muayene dosyası oluşturuldu ve ata takip amaçlı yapılan her muayenesinde ayrı bir form düzenlendi (ayrıntılı tendo muayenesi formu). Anamnez, klinik ve ultrasonografik muayeneler sonucunda elde edilen bilgiler, tendo muayene formunun ilgili bölümlerine kaydedildi. Muayenede kaydedilen bilgileri içeren bu muayene dosyaları ile ultrasonografik muayenelerde alınan görüntüleme ait çıktılar, ayrı bir klasörde arşivlendi. Her bir olguya, kronolojik sıraya göre dosya numarası verildi. Tüm veriler excel dosyası olarak bilgisayara da kaydedildi.

### İstatistiksel Yöntemler

Klinik ve ultrasonografik muayenelere göre tendinitis veya peritendinitis geçirmiş ya da geçirmekte olduğu olgularda, atlara ilişkin parametrelerin etkisini istatistiksel olarak değerlendirmek amacıyla SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, USA) 13.0 programı kullanıldı.

## BULGULAR

### ATLAR-Signalement

İkisinde bilateral sakatlanma tespit edilen, 118 safkan İngiliz ve Arap atlarına ait toplam 120 olgu çalışma materyali olarak değerlendirildi.

### İrk

Çalışma materyalini oluşturan 118 attan 62'sinin (% 52,5) Safkan İngiliz, 56'sının (% 47,5) Safkan Arap ırkı olduğu tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada değerlendirilen atların ırk ve cinsiyetlere göre dağılımı

İrk	Cinsiyet				Toplam	
	Kısırak (♀)		Aygır (♂)		n	%
	n	%	n	%		
İngiliz	19	51,4	43	53,1	62	52,5
Arap	18	48,6	38	46,9	56	47,5
<b>Toplam</b>	37	31,4	81	68,6	118	100,0

### Cinsiyet

Çalışma materyalini oluşturan 118 attan 37'sinin (% 31,4) dişi (kısırak), 81'inin (% 68,6) erkek (aygır) olduğu belirlendi. Otuz yedi kısıraktan 19'unun İngiliz (% 51,4), 18'inin Arap ırkı (% 48,6) olduğu tespit edildi. Seksen bir aygırdan 43'ünün İngiliz (% 53,1), 38'inin Arap ırkı (% 46,9) olduğu saptandı (Tablo 1).

## Yaş

Çalışma materyalini oluşturan atların yaşları, iki ile dokuz yaş arasında değişmekteydi. Yaş ortalaması  $4,1 \pm 1,6$  olan atların yaş gruplarına göre dağılımlarına bakıldığında, 2 yaşlı 15 (% 12,7), 3 yaşlı 33 (% 28,0), 4 yaşlı 34 (% 28,8), 5 yaşlı 12 (% 10,2), 6 yaşlı 16 (% 13,6), 7 yaşlı 4 (% 3,4), 8 yaşlı 1 (% 0,8) ve 9 yaşlı 3 (% 2,5) at olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada değerlendirilen atların ırk ve yaşlara göre dağılımları

İrk	Yaş (yıl)										Toplam							
	2		3		4		5		6		7		8		9		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%				
İngiliz	15	24,2	21	33,9	13	21,0	4	6,5	6	9,7	2	3,2	-	-	1	1,6	62	52,5
Arap	-	-	12	21,4	21	37,5	8	14,3	10	17,9	2	3,6	1	1,8	2	3,6	56	47,5
<b>Toplam</b>	15	12,7	33	28,0	34	28,8	12	10,2	16	13,6	4	3,4	1	0,8	3	2,5	118	100,0

Atlar yaşları bakımından 2-3 yaşlılar (yarışa yeni başlayanlar), 4-6 yaşlılar (yarış hayatının ortasında olanlar) ve 7 yaşından büyük olan (yarış hayatının sonunda olan) atlar şeklinde gruplandırıldığında, 2-3 yaş arasında toplam 48 at (% 40,7), 4-6 yaş arasında 62 at (% 52,5) ve 7 yaştan büyük olan toplam 8 at (% 6,8) olduğu belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Atların yaş gruplarına göre dağılımları

Yaş Grupları (yıl)	n	%
2-3	48	40,7
4-6	62	52,5
> 7	8	6,8
<b>Toplam</b>	118	100,0

## Cidago Yüksekliği

Cidago yükseklikleri 145 ile 178 cm arasında değişmekte olan atlar üç gruba ayrıldı. Buna göre atlar, cidago yükseklikleri 145-155 cm arasında olanlar (40/118, % 33,9), 156-165 cm arasında olanlar (66/118, % 55,9) ve 165 cm'den fazla olanlar (12/118, % 10,2) şeklinde gruplandırıldı. Bu gruplandırma temelinde, cidago yükseklikleri 145-155 cm arasında olan 1 at (% 1,6), 156-165 cm arasında olan 49 at (% 79,0) ve 165 cm'den fazla olan 12 (% 19,4) İngiliz ırkı at olduğu belirlendi. Arap ırkı atların cidago yüksekliklerine göre dağılımları incelendiğinde, 145-155 cm arasında 39 at (% 69,6), 156-165 cm arasında 17 (% 30,4) at olduğu ve 165 cm'den uzun at olmadığı belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4. Atların cidago yüksekliklerine göre dağılımları

İrk	Cidago Yüksekliği (cm)						Toplam	
	145-155		156-165		>165		n	%
	n	%	n	%	n	%		
İngiliz	1	1,6	49	79,0	12	19,4	62	52,5
Arap	39	69,6	17	30,4	-	-	56	47,5
<b>Toplam</b>	40	33,9	66	55,9	12	10,2	118	100,0

## Vücut Ağırlığı

Vücut ağırlıkları 342 kg ile 550 kg arasında değişmekte olan atlar dört gruba ayrıldı. Buna göre atlar, vücut ağırlıkları 400 kg'dan az olanlar (40/118, % 33,9), 401-450 arasında olanlar (39/118, % 33,1), 451-500 kg arasında olanlar (13/118, % 11,0) ve 550 kg'dan fazla olanlar (1/118, % 0,8) şeklinde gruplandırıldı. İngiliz ırkı atların vücut ağırlıklarına göre dağılımları incelendiğinde, 400 kg'dan daha zayıf at olmadığı, 401-450 kg arasında 26 at (% 41,9), 451-500 kg arasında 22 at (% 35,5), 501-550 kg arasında 13 at (% 21,0) ve 550 kg'dan ağır olan 1 at (% 1,6) olduğu belirlendi. Vücut ağırlıkları bakımından Arap ırkı atlar değerlendirildiğinde, 400 kg'dan daha zayıf olan 40 at (% 71,4), 401-450 arasında 13 at (% 23,2), 451-500 kg arasında 3 at (% 5,4) olduğu ve 501 kg'dan daha ağır at olmadığı tespit edildi (Tablo 5).

Tablo 5. Atların ırk ve vücut ağırlıklarına göre dağılımları

İrk	Vücut Ağırlığı (kg)										Toplam	
	< 400		401-450		451-500		501-550		> 550		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
İngiliz	-	-	26	41,9	22	35,5	13	21,0	1	1,6	62	52,5
Arap	40	71,4	13	23,2	3	5,4	-	-	-	-	56	47,5
<b>Toplam</b>	40	33,9	39	33,1	25	21,2	13	11,0	1	0,8	118	100,0

## Ultrasonografik Tanı

### Tendinitis

Ultrasonografik muayene bulgularına göre 120 olgudan, 102'sinde (% 85,0) tendinitis olduğu tespit edildi (Tablo 6).

### Peritendinitis

Yapılan ultrasonografik muayenelerde 120 olgudan 18'inde (% 15,0) tendolarda bir değişiklik görülmezsizin sadece peritendinitis olduğu belirlendi (Tablo 6).

Ultrasonografik tanıya göre tendinitis ve peritendinitis olarak gruplandırılan olguların ırk, cinsiyet, yaş, cidago yükseklikleri ve vücut ağırlıklarına göre dağılımları, sırasıyla,

Tablo 6. Olguların ultrasonografik tanıya göre dağılımı

Ultrasonografik tanı	n	%
Peritendinitis	18	15,0
<b>Toplam</b>	<b>120</b>	<b>100,0</b>

Tablo 7-8-9-10-11'de verilmiştir. Tendinitis ve peritendinitis olgularının yaş ve ırklara göre dağılımları da Tablo 12'de yer almaktadır.

Klinik ve ultrasonografik olarak bilateral sakatlanma tespit edilen Arap ırkı 2 atta (2/120, % 1,7), etkilenen her bir ekstremite ayrı birer olgu olarak değerlendirildi. Bu olgulardan birinde bilateral tendinitis (hafif dereceli), diğerinde ise farklı ekstremitelerinde unilateral tendinitis (FG) ve peritendinitis saptanmıştır.

Tablo 7. Irlara göre tendinitis-peritendinitis olgularının dağılımı

İrk	Ultrasonografik Tanı				Toplam	
	Tendinitis		Peritendinitis			
	n	%	n	%	n	%
İngiliz	49	48,03	13	72,2	62	51,7
Arap	53	51,96	5	27,8	58*	48,3
<b>Toplam</b>	<b>102</b>	<b>100,0</b>	<b>18</b>	<b>100,0</b>	<b>120</b>	<b>100,0</b>

\* Bilateral sakatlanma tespit edilen Arap ırkı 2 at nedeniyle şekillenen sayı artışı

Tablo 8. Cinsiyetlere göre tendinitis-peritendinitis olgularının dağılımı

Cinsiyet	Ultrasonografik Tanı				Toplam	
	Tendinitis		Peritendinitis			
	n	%	n	%	n	%
<b>Kısrak (♀)</b>	34	33,3	3	16,7	37	30,8
<b>Aygır (♂)</b>	68	66,7	15	83,3	83*	69,2
<b>Toplam</b>	<b>102</b>	<b>100,0</b>	<b>18</b>	<b>100,0</b>	<b>120</b>	<b>100,0</b>

\* Bilateral sakatlanma tespit edilen 2 aygır nedeniyle şekillenen sayı artışı

Tablo 9. Yaşlara göre tendinitis-peritendinitis olgularının dağılımı

Yaş (yıl)	Ultrasonografik tanı				Toplam	
	Tendinitis		Peritendinitis			
	n	%	n	%	n	%
2	13	12,7	2	11,1	15	12,5
3	29	28,4	4	22,2	33	27,5
4	27	26,5	9	50,0	36*	30,0
5	11	10,8	1	5,6	12	10,0
6	14	13,7	2	11,1	16	13,3
7	4	3,9	-	-	4	3,3
8	1	0,9	-	-	1	0,8
9	3	2,9	-	-	3	2,5
<b>Toplam</b>	<b>102</b>	<b>100,0</b>	<b>18</b>	<b>100,0</b>	<b>120</b>	<b>100,0</b>

\* Bilateral sakatlanma tespit edilen 4 yaşlı 2 at nedeniyle şekillenen sayı artışı (Bu atlardan birinde bilateral tendinitis, diğerinde ise farklı ekstremitelerinde unilateral tendinitis ve peritendinitis saptanmıştır)

Tablo 10. Cidago yüksekliklerine göre tendinitis-peritendinitis olgularının dağılımı

Cidago Yüksekliği (cm)	Ultrasonografik Tanı				Toplam	
	Tendinitis		Peritendinitis			
	n	%	n	%	n	%
145-155	38	37,3	1	5,6	39	32,5
156-165	59	57,8	16	88,8	75*	62,5
>165	5	4,9	1	5,6	6	5,0
<b>Toplam</b>	<b>102</b>	<b>100,0</b>	<b>18</b>	<b>100,0</b>	<b>120</b>	<b>100,0</b>

\* Bilateral sakatlanma tespit edilen cidago yüksekliği 157 ve 160 cm olan 2 at nedeniyle şekillenen sayı artışı

## TARTIŞMA ve SONUÇ

### Atlar - Signalement

#### İrklar

İngiliz yarış atlarında, galop sırasındaki gerilim nedeniyle MFDS tendosunun % 12-16 oranında uzadığı<sup>4,18,21</sup> ayrıca tendo merkezindeki fibrillerin 43-45 °C'ye kadar çıkan ısı nedeniyle hipertermik değişimlere maruz kaldığı bildirilmiştir.<sup>3,12,19</sup> Bu durum İngiliz yarış atlarında sıklıkla tendinitis şekillenmesinde önemli bir faktördür. Kalisiak (2012); 2001 2006 yılları arasında, Polonya'da Varşova Yarış Pistinde yarışan at popülasyonunun yalnızca % 64,45'inin İngiliz ırkı olduğu halde, tendinitis ve desmitis tanısı konulan

Tablo 11. Vücut ağırlıklarına göre tendinitis-peritendinitis olgularının dağılımı

Vücut Ağırlığı (kg)	Ultrasonografik Tanı				Toplam	
	Tendinitis		Peritendinitis			
	n	%	n	%	n	%
< 400	40	39,2	2	11,1	42	35,0
401-450	32	31,4	7	38,9	39*	32,5
451-500	17	16,7	8	44,4	25	20,83
501-550	12	11,8	1	5,6	13	10,83
> 550	1	0,9	0	0	1	0,83
<b>Toplam</b>	102	100,0	18	100,0	120	100,0

Tablo 12. Tendinitis-peritendinitis olgularının yaş ve ırklara göre dağılımları

Yaş (yıl)	İrklara Göre Ultrasonografik Tanı								Toplam	
	İngiliz Irkı				Arap Irkı					
	Tendinitis		Peritendinitis		Tendinitis		Peritendinitis			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2	13	26,5	2	15,4	-	-	-	-	15	12,5
3	18	36,7	3	23,0	11	20,8	1	20,0	33	27,5
4	8	16,3	5	38,5	19	35,8	4	80,0	36	30,0
5	3	6,1	1	7,7	8	15,1	-	-	12	10,0
6	4	8,2	2	15,4	10	18,8	-	-	16	13,3
7	2	4,1	-	-	2	3,8	-	-	4	3,3
8	-	-	-	-	1	1,9	-	-	1	0,8
9	1	2,1	-	-	2	3,8	-	-	3	2,5
<b>Toplam</b>	49	100,0	13	100,0	53	100,0	5	100,0	120	100,0
	n=62				n=58*					

atlardan % 84,49'unun İngiliz ırkı olduğunu bildirmiş, İngiliz ırkı yarış atlarının tendo lezyonu oluşumu bakımından büyük bir risk altında olduğunu vurgulamıştır. Aynı çalışmada, Arap ırkı yarış atlarında tendinitis prevalansı % 15,5 olarak bildirilmiştir. İngiliz aygırların yüksek cidago-ya ve fazla vücut ağırlığına sahip cüsselerinin, tendinitise predispozisyon oluşturabileceği vurgulanmıştır.<sup>18</sup>

Kalisiak Arap aygırlara ilişkin bilinen bir tendinitis prevalansı olmadığını belirtmiştir.<sup>18</sup> 2005-2012 yılları arasında Amerika'da yarışlara katılan Arap atlarında karşılaşılan muskuloskeletal yaralanmaların irdelendiği retrospektif bir çalışmada, MFDS tendinitis prevalansı % 19,0 (8/42) ve musculus interosseus medius'a ilişkin desmitis prevalansı ise % 7,1 (3/42) oranında tespit edilmiştir.<sup>20</sup> Yapılan literatür taramalarında, Safkan Arap ırkı yarış atlarında karşılaşılan tendinitis olgularıyla ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmış olması<sup>18,20</sup> dünyadaki at populasyonu içerisinde

İngiliz ırkı yarış atlarının önemli bir yer tutması nedeniyle, bu konu hakkında yapılan çalışmaların daha çok İngiliz ırkı atlar üzerinde yapılmasından kaynaklandığını düşündürdü.

Ülkemizde TJK tarafından, sıcak kanlı at ırklarından İngiliz ve Arap ırkı atlar için yarışlar düzenlenmektedir. Bu yarışlarda, her at kendi ırkından atlarla yarışmaktadır.<sup>22</sup> Çalışma materyalini oluşturan 118 attan 62'sinin (% 52,5) İngiliz, 56'sının (% 47,5) Arap ırkı olduğu belirlendi. Buna göre İngilizler'de tendinitis % 79,0 (49/62), peritendinitis ise % 20,9 (13/62) oranında tespit edildi. Araplar'da % 91,4 (53/58) oranında tendinitis, % 8,6 (5/58) oranında peritendinitis belirlendi. Ancak tendinitis insidansı bakımından yapılan değerlendirmelerde bu iki ırk arasındaki farklılık, istatistiksel olarak önemli bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Bu durum, yüksek hızda koşma kapasiteleri bakımından geliştirilmiş olan bu ırkların, biyomekaniksel olarak benzer özelliklere sahip olabileceğini, bu konuda detaylı çalışmalar yapılması gerektiğini düşündürdü.

### Cinsiyet

Moreira ve arkadaşlarının 2016-2018 yılları arasında Brezilyada ortopedik yaralanmaların yaygınlığı ile klinik epidemiyolojik bulguların belirlenmesi amacıyla yaptığı retrospektif bir çalışmada (2019), ortopedik yaralanma tespit edilen 156 olgudan 71'inin dişi (% 45,5) ve 85'inin erkek (% 54,5) olduğu belirtilmiştir. 10 2002 ve 2004 yıllarında Japon Yarış Birliği'ne (Japan Racing Association-JRA) kayıtlı olan atlarda, farklı çalışmalarda yapılan değerlendirmelere göre, cinsiyete göre tendinitis ve desmitis prevalansının aygırlarda, kastre edilmiş erkeklere ve dişilere oranla fazla olduğu belirlenmiş ve oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ).<sup>12,21</sup> Kalisiak, 2001-2006 yılları arasında, Polonya'da Varşova Yarış Pistinde yarışan at populasyonunu değerlendirdiği çalışmada (2012), İngiliz aygırlardaki tendinitis prevalansının kısraklara oranla tüm yaş gruplarında daha yüksek olduğunu vurgulamış, Arap ırkı atlarda da benzer bir durumun söz konusu olduğunu belirtmiş, ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ifade etmiştir. İngiliz aygırlardaki tendinitis prevalansının yüksek olmasını kısrakların daha az sıklıkla yarıştırılmasıyla ilişkilendirmiştir.<sup>18</sup> Aynı çalışmada, Arap atlarında erkeklerin dişilere göre her yaş grubunda daha fazla yarış koştuğu ve bunun istatistiksel olarak da önemli derecede anlamlı olduğunu ( $p=0,011$ ) tespit edilmiştir.<sup>18</sup>

Erkeklerin, dişilerden daha fazla oranda tendinitise maruz kalmış olması, dişilerin mizaçları nedeniyle başka amaçlarla<sup>10</sup> veya damızlık olarak kullanılmaları<sup>10,13</sup> bakımından



erkeklere oranla daha erken dönemde yarışlardan çekilmiş olmasıyla ve erkeklerin, dişilere oranla daha hızlı koşuyor olmalarıyla ilişkilendirilmektedir.<sup>13</sup>

Çalışma materyalimizi oluşturan atlardan % 31,4'ü dişi (37/118), % 68,6'sı erkektir (81/118). Dişilerde tendinitisin % 91,9 (34/37), peritendinitisin % 8,1 (3/37) oranında görüldüğü tespit edildi. Erkeklerde ise, tendinitisin % 81,9 (68/83\*), peritendinitisin % 18,1 (15/83\*) oranında görüldüğü belirlendi. Ancak tendinitis insidansı bakımından yapılan değerlendirmelerde cinsiyetler arasındaki farklılık, istatistiksel olarak önemli bulunmadı ( $p > 0,05$ ).

Çalışmamızda, sakatlanan erkek at sayısının, hem İngiliz hem de Arap ırkı yarış atlarında, dişilere göre daha yüksek olması (81'e karşılık 37) literatür bilgisiyle<sup>10,12,13,18,21</sup> uyumlu bulundu. Bu durum antrenman ve yarışlara daha yüksek oranda katılan erkeklerin, daha hızlı ve/veya daha uzun mesafelerde koşturulmaları ihtimalleriyle ilişkilendirildi. Bununla birlikte, kısrakların damızlık olarak da kullanılabilme alternatifleri nedeniyle, sahiplerinin muayene ve sağaltım masraflarını göze almamaları neticesinde daha az oranda muayeneye sunuldukları da düşünülebilir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da, tendinitise maruz kalan erkek at oranının dişilere kıyasla nispeten düşük olması (% 81,9'a karşılık % 91,9), koşu performansları ön planda tutulan erkek yarış atlarında at sahiplerinin/antrenörlerinin koruyucu önlemler ve sağaltım bakımından daha duyarlı davranmaları ile ilişkilendirilebilir.

\* 81 erkek ata ait toplam 83 olgu (68 tendinitis ve 14 peritendinitis) değerlendirilmiştir" ifadesini veren

## Yaş

Yaşlı atlarda daha çok şekillendiği ortaya konulmuş olan yumuşak doku lezyonlarından<sup>17</sup> tendinitisin insidansında, yaşlılığa bağlı olarak artış şekillendiği belirlenmiştir.<sup>3,13,21</sup> Kasashima ve arkadaşları<sup>21</sup>, 1999 yılında JRA'da yarışan 10.262 İngiliz atında,  $\geq 3$  yaşlı atlarda ön bacaklarda tendinitis ve desmitis risklerinin, 2 yaşlı atlara oranla iki kattan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Üç ve 4 yaşından büyük atlarda da hem tendinitis riskinin hem de desmitis riskinin arttığı da ortaya konulmuştur ( $p < 0,01$ ).<sup>21</sup> Takahashi ve arkadaşlarının, 2002 yılı JRA kayıtları kapsamında yaptıkları değerlendirmede<sup>12</sup> yaşlı atların genç atlara kıyasla daha fazla yarış koştuğu, dolayısıyla toplam yarış mesafelerinin de daha fazla olduğu belirtilmiştir. Buna göre, yaşlı atlarda tendinitise predispozisyonun, mikrohasarların kümülatif etkisiyle ortaya çıkan dejenerasyonlarla ilişkilendirilebileceği söylenmiştir.<sup>12</sup>

Tendinitis prevalansının henüz antrenmanlara ve yarışlara yeni hazırlanmakta olan 2 yaş civarındaki atlarda yüksek

olduğu bildirilmiştir.<sup>6,15,23</sup> İki yaşlı tayların tendoları daha yaşlı tayların tendolarıyla kıyaslandığında, yaşlı olanlarda tendo elastikiyet modülasyonunun anlamlı derecede daha fazla olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,01$ ).<sup>23</sup> Bu nedenle tendinitisin prevalansı, genellikle antrenmanlarına 2 yaşında başlayıp ve sıklıkla 3 yaşından önce dört yarış tamamlayan ve tendonun içsel gerilim direnciyle ilişkili elastik modülüsü düşük olan, 2 yaş civarındaki İngiliz yarış atlarında yüksektir.<sup>23</sup> Çok genç taylarda, yüksek seviyede yaptırılan egzersizlerin henüz gelişme döneminde olan tendoların çok daha kolay hasarlanmasına neden olduğu, çok düşük seviyeli egzersizlerin de tendo gelişimini baskıladığı bildirilmiştir.<sup>15</sup> Bununla beraber, artan yaşın, egzersizin kümülatif etkisinden daha fazla oranda MFDS tendinitise predispozisyon oluşturduğu da ileri sürülmüştür.<sup>12</sup>

İki yaş civarında erişkin vücut ağırlıkları ve yüksekliklerinin yaklaşık % 80'ini kazanmış ve seksüel olgunluğa erişmiş olan Safkan İngiliz atlar, 2-5 yaş arasında ergen, 5-16 yaş arasında erişkin ve  $> 16$  yaşlılar ileri yaşlı olarak değerlendirilmektedir.<sup>23</sup> Bu değerlendirme temelinde, 2 ile 9 yaş aralığında olan çalışma materyalini oluşturan atların 94'ü ergen (94/118, % 79,7), 24'ü erişkin (24/118, % 20,3) olarak gruplandırılabilir. Buna göre, İngiliz atlardan 53'ü ergen (% 85,5), 9'u (% 14,5) erişkin, Araplardan 41'i ergen (% 73,2), 15'i erişkin (% 26,8) olarak değerlendirilebilir. Yaş dağılımına göre, 6 yaş sonrasında yarış kariyerine devam eden at sayısının oldukça düşük olduğu belirlendi. Buna göre, 7 (% 3,4, 4/118), 8 (% 0,8, 1/118) ve 9 yaşlı (% 1,7, 2/118) olan toplam 8 at (% 6,8) bulunmaktadır. Çalışmamızda, yaş gruplarına göre sakatlanan atların yüksek oranda ergen (% 79,7) geri kalanların ise erişkin olması (% 20,3) ve ileri yaşlı at olmaması, literatür bilgilerini<sup>6,15,23</sup> desteklemektedir. Bu durum, ilk yarış sezonunda ve öncesinde yaptırılan ağır egzersizler neticesinde, henüz gelişme döneminde olan ergenlerde, yaşlı atlara kıyasla, elastik modülasyon kabiliyeti az olan tendoların<sup>23</sup> daha kolay hasarlanmasıyla ilişkilendirilebilir. Atların yaşı doğum yıllarına göre belirlenmektedir. Buna göre aynı yılın Ocak ayında doğan bir tay ile Haziran ayında doğan aynı ırk bir başka tay, doğum yılı itibarıyla, aynı yaş grubunda değerlendirilir. Ocak doğumlu olan tay, Haziranda doğan taya göre, fiziksel gelişimi bakımından 6 ay kadar daha gelişmiş olmasına rağmen, yarış çağına geldiklerinde (İngiliz ırkı atlar için yarışlara başlama yaşı 2 yaş, Arap ırkı atlar için 3 yaştır) her iki tay aynı sezonda yarışa başlayacaktır. Bu durumun antrenman ve yarışlara adaptasyon bakımından, bireysel olarak önemli farklılıklara neden olabileceği düşünüldü. Bu nedenle, doğum sezonunun son aylarında doğan tayların, yaş grubuna göre daha az gelişmiş olacağını göz önünde bulunduran yetiştiricilerin, damızlık kıs-



raklarını doğumları Ocak ayında olacak şekilde tohumlama düşüncesinde/çabasında oldukları bilinmektedir. Atın fiziksel gelişimini mümkün olduğunca tamamlayarak yarış koşmaya başlamasının, yarış performansını olumlu etkileyeceği düşünülerek, bu uygulama doğru bir tercih olarak değerlendirilebilir.

TJK hipodromlarında, "Genel Hükümler" olarak bilinen kurallar her yıl yeniden düzenlenmektedir.<sup>22</sup> Bu hükümlerde, hipodromlarda düzenlenen yarışlara katılabilecek olan atlar, yaşları ve performanslarına göre belirtilmektedir. Bu kapsamda, her bir hipodrom için yarışlara katılabilecek olan atların, alt ve üst yaş limitleri belirlenir (tüm hipodromlarda alt yaş limiti İngiliz atları için 2 yaş, Arap atları için 3 yaştır). Örneğin; 2019 yılında koşulara katılacak Arap atlarından 3, 4, 5, 6 ve 7 yaşlı (2012 doğumlu dahil) olanların İstanbul Hipodromu'ndaki koşulara, 2, 3, 4, 5, 6 yaşlı (2013 doğumlu dahil) atlar ile 2018 yılı içinde en az bir kısa vadeli koşu kazanan 9 yaşlı (2010 doğumlu) atların Adana, İzmir, Bursa ve Ankara Hipodromlarındaki koşulara, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 yaşlı (2009 doğumlu dâhil) atların ise sadece Diyarbakır, Elazığ, Kocaeli ve Şanlıurfa Hipodromlarında yarışlara katılabilecekleri bildirilmiştir. Böylece yoğun talep gören hipodromlarda düzenlenen yarışlarda, genç olmaları nedeniyle başarılı olma ihtimalleri yüksek görülen atlar yarıştırmaktadır. Bununla birlikte, yine 2019 yılı genel hükümlerine göre, son koştuğu 20 koşuda en az bir birincilik veya en az iki ikincilik ya da dört adet tabela (2.lük, 3.lük, 4.lük) yapamamış olan atlar hiç bir hipodromdaki koşulara iştirak edemezler.<sup>22</sup> Bu uygulamaların, ileri yaşta yarış kariyerine devam eden at sayısını olumsuz yönde etkilediği açıktır.

Çalışmamızda, ileri yaşta yarış kariyerine devam eden at olmadığı gibi erişkin at sayısı (24/118, % 20,3) da azdır. Literatür bilgisini 12 desteklemekte olan bu sonuç, TJK hipodromlarındaki yarışlar için belirlenen yaş üst limiti ve 20 yarış koşmasına rağmen başarılı olmayan atların yarışmasına izin verilmemesi uygulamalarıyla ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte, artan yaşla birlikte ortaya çıkan kümülatif mikrohasarlar neticesinde performansları azaldığı için, yaşlı atların yarışlardan uzaklaştırılmış olabileceği de düşünülebilir. Aynı sebeple, sahiplerinin muayene ve sağaltım masraflarını göze almamaları neticesinde yaşlı atların daha az oranda muayeneye sunuldukları da düşünülebilir. Ancak bu sonuç yaş dağılımı daha geniş ve denek sayısı daha fazla olan çalışmalarla desteklenmelidir.

Yaş ortalaması  $4,1 \pm 1,6$  olan 118 atın yaş gruplarına göre dağılımlarına bakıldığında, İngiliz ırkı içerisinde 3 yaşlı atların (21/62, % 33,9), Arap ırkı içerisinde ise 4 yaşlı at-

ların (22/56, % 39,3) en fazla oranda sakatlanmış olduğu belirlendi. Ayrıca, tendinitis ve peritendinitis olgularının yaşlara göre dağılımı irdelendiğinde (Tablo 9), tendinitis insidansının 3 ve 4 yaşlı atlarda daha yüksek olduğu da görülmektedir (sırasıyla % 27,5 ve % 30,0). Bu atlar ırklarına göre değerlendirildiğinde (Tablo 12); en yüksek tendinitis insidansının İngiliz ırkı atlarda en yüksek oranda 3 yaş grubunda (18/49, % 36,7), Arap ırkı atlarda ise 4 yaş grubunda (19/53, % 35,8) olduğu tespit edilmiştir. İngiliz ırkı atların 2 yaşında, Arap ırkı atların ise 3 yaşında yarışlara başladığı göz önünde bulundurulduğunda, atların daha çok ilk yarış sezonu sonrasında daha yüksek oranda sakatlandığı görüldü. Bu durum, yarış ve antrenmanlara yeni başlayan genç atlarda, tendinitis prevalansının yüksek olduğunu bildiren literatürleri <sup>6,15,23</sup> destekler niteliktedir. Buna göre, fiziksel olarak henüz gelişme çağını tamamlayamamış genç yaşta taylorların, yarış temposu ve koşullarına adapte olamadıkları düşünülebilir. Bununla beraber, çalışmamızda 2 ve 3 yaş grubundan ikişer İngiliz atı (4/120, % 3,3) ile 3 yaş grubundan bir Arap atının (3/120, % 2,5) sakatlanma öncesinde hiç yarış koşmadığı, yani toplam 5 atın (5/102, % 4,9) ilk yarış sezonu öncesinde sakatlandığı belirlendi. Bu oran, etkilenen atların % 25'inde ilk yarış sezonu öncesinde, % 50'sinde ise ilk yarış sezonu öncesinde ve ilk dört yarışın yapıldığı dönem içerisinde tendinitis şekillendiğini belirten literatüre kıyasla 24 düşüktür. Bu farklılığın değişik ülkelerdeki antrenman ve egzersiz programlarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünüldü.

### Cidago Yüksekliği

Bir yaşlı sıcakkanlı Hollanda atlarında; vücut ağırlığı, cidago yüksekliği gibi fiziksel parametrelerle tendo ve ligament boyutları arasında doğru orantılı bir ilişki, vücut ağırlığı ve cidago yüksekliği gibi fiziksel parametreler arttıkça tendo ve ligament boyutlarının da arttığı bildirilmiştir.<sup>4</sup> Tendinitis oluşumunda, vücut ağırlığıyla ilişkili olan uzun bukağlık veya uzun ekstremite gibi diğer faktörlerin de etkili olabileceği belirtilmiştir.<sup>12</sup> İri cüsseli İngiliz aygırların tendinitise predispoze olabileceği vurgulanmıştır.<sup>18</sup>

Kalisiak, 2001-2006 yılları arasında, Polonya'da Varşova Yarış Pistinde yarışan at popülasyonunu değerlendirdiği çalışmada (2012), İngiliz atlarındaki vücut ölçümlerinin tendinit prevalansı üzerindeki etkisini açıkça göstermiştir. Bu çalışmada tendinitis saptanan 2 ve 3 yaşlı İngilizlerin, yaklaşık 2 cm daha yüksek cidagoya sahip olduğu (sırasıyla  $p \leq 0.001$  ve  $p \leq 0.001$ ), bununla birlikte aynı cinsiyet ve yaş grubundaki ortalamaya kıyasla yaklaşık 1,5 cm daha büyük bir göğüs çevresine sahip olduğu (sırasıyla  $p=0.005$  ve  $p \leq 0.001$ ) ortaya konulmuştur.<sup>18</sup> Aynı çalışmada değerlendirilen Arap yarış atlarında cinsiyetler arasında yükseklik ve torasik çevrenin istatistiksel olarak farklı olmadığı

bildirilmiştir.<sup>18</sup>

Çalışmamızda, İngiliz ırkı atların cidago yüksekliklerine göre dağılımları incelendiğinde, 145-155 cm arasında olan 1 at (% 1,6), 156-165 cm arasında olan 49 at (% 79,0) ve 165 cm'den uzun olan 12 at (% 19,4) olduğu belirlendi. Arap ırkı atların cidago yüksekliklerine göre dağılımlarına bakıldığında, 145-155 cm arasında 39 at (% 69,6), 156-165 cm arasında 17 at (% 30,4) olduğu ve 165 cm'den daha uzun Arap atı olmadığı belirlendi. Buna göre, İngiliz ırkı atların cidago yükseklikleri, Arap ırkı atlara kıyasla daha fazladır. Tendinitis oluşumunda uzun bukağılık ya da uzun ekstremite gibi faktörlerin etkili olabileceği 12 ve vücut ağırlığı ile cidago yüksekliği arttıkça tendo ve ligament boyutlarının da arttığı göz önünde bulundurularak, cidago yükseklikleri bakımından ırklar arasında saptanan farklılığının, tendinitis/peritendinitis insidansı üzerinde etkili olabileceği düşünüldü. Ancak cidago yükseklikleri bakımından yapılan değerlendirmelerde, istatistiksel olarak önem taşıyan herhangi bir anlamlı sonuç elde edilmedi. Çalışma materyalini oluşturan olgular içerisinde kıyaslama yapılabilecek sağlıklı atlardan oluşan bir kontrol grubunun olmaması ve olgu sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülen bu sonucun, tendinitisli/peritendinitisli atlarla sağlıklı atlardan oluşan bir kontrol grubu arasında cidago yükseklikleri bakımından karşılaştırma yapan, denek sayısı fazla olan, çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısına varıldı.

### Vücut Ağırlığı

Vücut ağırlığı fazla olan ya da yükü (jokeyi veya handikapı) ağır olan atlarda,<sup>3,16,18,19</sup> vücut ağırlığının taşınmasında önemli bir rolü olan tendoların daha fazla yük altında kaldığı ve bu durumun tendinitise predispozisyon oluşturabileceği belirtilmiştir.<sup>6,12,18</sup> Oikawa ve Kasashima'nın yaptığı bir çalışmada,<sup>3</sup> tendinitisli atlarla tendinitisli olmayan atlar vücut ağırlıkları bakımından karşılaştırılmıştır. Tendinitis şekillenen aygırların vücut ağırlıkları ortalamasının 477,8 kg, kısıraklarda ise 460,0 kg olduğu, buna göre tendinitisli aygırların kısıraklardan 17,8 kg, bu kısırakların da tendinitisten etkilenmeyen atlara oranla ortalama 12 kg daha ağır olduğu tespit edilmiş ve bu farklılıklar istatistiksel bakımdan da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).<sup>3</sup> Takahashi ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada<sup>12</sup>, tendinitis şekillenen atlarda ( $n=515$ ) ortalama vücut ağırlığının  $473 \pm 27$  kg, kontrol grubundaki atlarda ( $n=951$ ) ise  $466 \pm 28$  kg olduğu belirlenmiş ve aradaki farklılık istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte, belirli bir vücut konformasyonuna sahip atların mı, yoksa vücut ağırlığı fazla olan atların mı tendinitise daha duyarlı olduğunun halen bilinmediği, bu nedenle vü-

cut ağırlığı fazla olan atların, tendinitise predispoze olduğu düşünülerek dikkat edilmesinin profilaksi bakımından yararlı olacağı vurgulanmıştır.<sup>13</sup>

Çalışmamızda, vücut ağırlıkları 342 kg ile 550 kg arasında değişmekte olan olgular dört gruba ayrıldı. İngiliz ırkı atların vücut ağırlıklarına göre dağılımları incelendiğinde, 400 kg'dan daha zayıf at olmadığı, 401-450 arasında 26 at (% 41,9), 451-500 kg arasında 22 at (% 35,5), 501-550 kg arasında 13 at (% 21,0) ve 550 kg'dan ağır olan 1 at (% 1,6) olduğu belirlendi. Vücut ağırlıkları bakımından Arap ırkı atlar değerlendirildiğinde, 400 kg'dan daha zayıf olan 40 at (% 71,4), 401-450 arasında 13 at (% 23,2), 451-500 kg arasında 3 at (% 5,4) olduğu ve 501 kg'dan ağır at olmadığı tespit edildi. Buna göre, cidago yükseklikleri bakımından Arap ırkı atlara kıyasla daha uzun olan İngiliz ırkı atlar, vücut ağırlıkları bakımından da Arap atlarına göre daha ağırdır. Bu durumun, etiyolojik açıdan tendinitis/peritendinitise hazırlayıcı bir faktör olarak insidans bakımından bir farklılık oluşturabileceği düşünüldü ancak vücut ağırlıklarına göre yapılan değerlendirmelerde, istatistiksel olarak önem taşıyan herhangi bir anlamlı sonuç elde edilmedi. Bu sonucun, tendinitisli/peritendinitisli atlarla sağlıklı atlardan oluşan bir kontrol grubu arasında vücut ağırlıkları bakımından karşılaştırma yapan, denek sayısı daha fazla olan ve yarışlardaki jokey ağırlıklarını da dikkate alan başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısına varıldı.

### Sonuç

Türkiye koşullarında tendinitis geçiren Safkan yarış atlarına ilişkin etiyolojik faktörleri irdelemek amacıyla planlanan bu çalışmada; yarış atlarında ırk, yaş, cinsiyet, cidago ve vücut ağırlığı faktörlerinin tendinitis insidansına etkisi araştırılmıştır.

Sunulan çalışmada olgular içerisinde kıyaslama yapılabilecek sağlıklı atlardan oluşan bir kontrol grubunun olmaması ve olgu sayısının az olması çalışmanın kısıtlayıcı faktörleridir. Safkan yarış atlarında görülen tendo lezyonları bakımından ihtiyaç duyulan epidemiyolojik çalışmaların, mümkün olduğunca fazla denek sayısı ve karşılaştırma yapılabilecek sağlıklı atlardan oluşan bir kontrol grubuyla değerlendirilmesinin daha faydalı olacağı kanısına varıldı.

Bununla beraber, her ne kadar çalışmamızda yapılan istatistiksel değerlendirmelerde anlamlı sonuçlar ortaya çıkmamış olsa da, Türkiye koşullarında tendinitis geçiren safkan İngiliz ve Arap ırkı yarış atlarına ilişkin etiyolojik faktörler bakımından (ırk, yaş, cinsiyet, cidago ve vücut ağırlığı) elde edilen bulguların literatürle<sup>2,3,6,10,12,13,15,18,21,23</sup> uyumlu olması dikkat çekici bulunmuştur.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde önemli katkıları olan emekli öğretim üyeleri Prof. Dr. Sayın O. Sacit GÖRGÜL ve Prof. Dr. Sayın Kamil SEYREK-İNTAŞ'a çalışmanın istatistiksel değerlendirmelerinde yardımcı olan emekli öğretim üyesi Dr. Sayın Bülent EDİZ ve Araş. Gör. Dr. Sayın Ender ÇARKUNGÖZ'e teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Cherdchutham W. The equine superficial digital flexor tendon: the influences on exercise on early development and of diathermy on tendon healing. Ph.D. Thesis Utrecht University, ISBN 90-393-2739-4, The Netherlands, Utrecht, 2001.
2. Belt A J M van den. Ultrasonography of equine flexor tendons and ligaments. Universiteit Utrecht Fakulteit Der Diergeneeskunde, Thesis Universiteit Utrecht, ISBN 90-3931031-9, Febodruk BV- enschece, Utrecht, 9-70, 1995.
3. Oikawa M A, Kasashima Y. The Japanese experience with tendonitis in racehorses. *J Equine Sci.* 2002;13(2): 41-56.
4. Dowling B A, Dart A J, Hodgson D R, et al. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J.* 2000;32(5): 369-378.
5. Gillis C, Pool R R, Meagher D M, et al. Effect of maturation and aging on the histomorphometric and biochemical characteristics equine superficial digital flexor tendon. *Am J Vet Res.* 1997;58(4): 425-430.
6. O'Sullivan C B. Injuries of the flexor tendons: focus on the superficial digital flexor tendon, *Clin Tech Equine Pract*, 6, 189-197, 2007.
7. Seyrek-İntaş D, Çelimli N. Atlarda tendinitislerde iyileşme ve güncel sağaltım yöntemleri. I. Ulusal Atçılık Sempozyumu Tebliğ Özetleri Kitabı, Konya, 251-267, 1999.
8. İde T, Spor atlarında karpal eklem altındaki şirurjikal lezyonların istatistiki değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Cerrahi ABD Yüksek lisans tezi, 1995
9. Alkan Z, Bumin A, Temizsoylu D, et al. Yarış atlarında topallığa neden olan ekstremite lezyonlarının değerlendirilmesi. II. Ulusal Atçılık Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı) Özet Kitabı, Nevşehir, 62-63, 2004.
10. Moreira I L, Campebell R C, Teixeira-Neto A R, et al. Orthopedic injuries in 156 equids from Distrito Federal, Midwestern Brazil, *Rev Bras Med VeT*, 41, 2019 e095619. doi: 10.29374/2527-2179. bjvm095619
11. Yoon J H, Brooks R L JR, Khan A, et al. The effect of enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horse tendon cells, *Cell Biol Toxicol.* 2004;20(1): 41-54.
12. Takahashi T, Kasashima Y, Ueno Y. Association between race history and risk of superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *JAVMA-J Am Vet Med A.* 2004;225(1): 90-93.
13. Oikawa M A. Some aspects of tendinitis in Thoroughbred racehorses in Japan. *Japan Racing Journal.* 2002;10(5): 11-12.
14. Kasashima Y, Kuwano A, Katayama Y, et al. Magnetic resonance imaging application to live horses for diagnosis of tendinitis. *J Vet Med Sci.* 2002;64(7): 577-582.
15. Smith R.K W, Birch H L, Batson E L, et al. A Review of the etiopathogenesis, and current proposed strategies for prevention of superficial digital flexor tendinitis in the horse. *AAEP Proceedings*, 43, 54-58, 2000.
16. Watkins J. P. eds. Auer J.A., Stick J.A. *Equine Surgery*. 2nd ed, W. B. Saunders Company, ISBN 0-7216-7733-9, USA, 1999.
17. Wilson J H, Robinson R A, Jensen R C, et al. Equine soft tissue injuries associated with racing descriptive statistics from American racetracks. *Dubai International Equine Symposium Proceedings*, 1-21, 1996.
18. Kalisiak O. Parameters influencing prevalence and outcome of tendonitis in Thoroughbred and Arabian racehorses. *Pol J Vet Sci.* 2012;15(1): 111-118.
19. Mcilwraith C W, eds. Stashak T S, Adams' *Lameness in Horses*, 5th edition, ISBN: 0-683-07981-6, USA, Lipponcott, Williams &Wilkins; 2002.
20. Dallas R S. *Musculoskeletal Injury in Arabian Racehorses: A Study of Injury Distribution and Prevalence in One Training Yard in the United Kingdom (2005*

2012). British Equine Veterinary Association Congress Clinical Research Abstracts Volume 45 Supplement 44, 10, 2013.

21. Kasashima Y, Takahashi T, Smith R K, et al. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet J.* 2004;36(4): 346-350.
22. Türkiye Jokey Kulübü Derneği At Yetiştiricileri ve Yarışları İktisadi İşletmesi Resmi Web Sayfası. <http://www.tjk.gov.tr>. Accessed August 08, 2019.
23. Gillis C, Sharkey N, Stover S, et al. Effect of maturation and aging on the material and ultrasonographic properties of equine superficial digital flexor tendon. *Am J Vet Res.*1995;56 (10): 1345-1350.
24. Rooney J R, Genovese R L. A survey and analysis of bowed tendon in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet Sci.* 1981;49-52.



# Antimikrobiyal dirençli *Escherichia coli*'de geniş spektrumlu $\beta$ -laktamaz direncinin araştırılması

● Murat Cengiz\*<sup>1</sup>, ● Ulvi İbrahimli<sup>1</sup>

1 Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,  
Moleküler Farmakoloji Laboratuvarı, 16059, Bursa

Received 2019-12-17 Accepted 2020-04-09

## Özet

*Escherichia coli* (E. coli) insan ve hayvanlarda birçok enfeksiyona neden olan önemli mikroorganizmalardan biridir. E. coli'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde  $\beta$ -laktamların sık kullanılması  $\beta$ -laktam direncinin gelişmesi bakımından önemli bir nedendir.  $\beta$ -laktamazlar,  $\beta$ -laktam direncinin bilinen mekanizmalarından biridir ve geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar (GSBL) yüksek morbidite ve mortaliteden sorumludur. Bu çalışmanın konuları, GSBL varlığının araştırılması ve GSBL ile diğer birçok antimikrobiyal bileşiğe karşı direnç ilişkisinin değerlendirilmesidir.  $\beta$ -laktam direncini belirlemek için disk difüzyon ile broth mikrodilüsyon testleri kullanıldı ve direncin genotiplendirmesi için blaSHV geninin varlığını araştırıldı. Buna göre 112 E. coli izolatının sadece bir tanesi GSBL pozitif olarak tanımlandı. Ayrıca, broth mikrodilüsyon test sonuçlarına göre 18 izolatın seftazidime ve 32 izolatın ise sefotaksime karşı dirençli olduğu belirlendi. E. coli izolatlarının hiçbirinde blaSHV geni tespit edilemedi. Sonuç olarak E. coli izolatlarının  $\beta$ -laktamlara karşı dirençli olabileceği, ancak GSBL pozitif izolatların ve GSBL ile diğer antimikrobiyal bileşiklere karşı direncin birlikte görülme sıklığının çok düşük olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*,  $\beta$ -laktamaz, antimikrobiyal direnç

## Abstract

### Investigation of extended-spectrum $\beta$ -lactamase resistance in antimicrobial resistant *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (E. coli) is one of the most important microorganisms causing various infections in animals as well as in humans. The overuse of  $\beta$ -lactams for treatment of infectious diseases caused by E. coli is an important reason of emergence of  $\beta$ -lactam resistance.  $\beta$ -lactamases are well known mechanism of  $\beta$ -lactam resistance and extended spectrum  $\beta$ -lactamases (GSBL) are responsible for the high morbidity and mortality. The objectives of this study are to investigate of existence of GSBL in E. coli and to evaluate the correlation between GSBL and resistance to many other antimicrobials. Disc diffusion and broth microdilution test were used to determine  $\beta$ -lactam resistance and existence blaSHV gene was investigated for its genotyping. Based on the results of disc diffusion test, only one of 112 E. coli isolates was defined as GSBL positive. However, the results of broth microdilution test showed that the numbers of ceftazidime and cefotaxime resistance positive E. coli isolates were 18 and 32, respectively. blaSHV gene could not be detected in any of the E. coli isolates. The results of this study showed that E. coli isolates could be resistant against  $\beta$ -lactams, but the frequency of GSBL positive isolates and the co-existence of GSBL with resistance to other antimicrobials was very low.

Key words: *Escherichia coli*,  $\beta$ -lactamase, antimicrobial resistance

## Giriş

İnsan ve hayvanlarda sıklıkla gastroenteritislere, idrar yolu

enfeksiyonlarına ve septisemilere neden olan Enterobacteriaceae ailesinin en önemli üyesi *Escherichia coli*'dir (E. coli). E. coli kökenli enfeksiyonların tedavisinde  $\beta$ -lak-

\* Corresponding author: Murat Cengiz, cengizm@uludag.edu.tr, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Bursa.



tam grubu ilaçların sık kullanılması  $\beta$ -laktam direncinin gelişmesine ve yaygınlaşmasına neden olabilir.  $\beta$ -laktam direncinin primer etmeni  $\beta$ -laktamaz enzimleridir ve bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak üretilen yeni enzimler geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz enzimleri (GSBL) olarak tanımlanır.<sup>1-3</sup> GSBL üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda morbidite, mortalite ve tedavi maliyeti yüksektir.<sup>4</sup>

$\beta$ -laktam grubu antimikrobiyaller, yapılarında bir  $\beta$ -laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini engelleyerek antibakteriyel etki gösteren ajanlardır.<sup>5</sup> Bakteriler (1) hücre duvarı geçirgenliğinin azaltılması, (2) atım pompası aktivasyonu, (3) penisilin bağlayıcı proteinlerdeki modifikasyonlar ve (4)  $\beta$ -laktamaz üretimine bağlı olarak  $\beta$ -laktamlara karşı direnç geliştirir.<sup>6</sup> E. coli'de  $\beta$ -laktamaz direncinin en önemli genetik nedeni SHV-1 ve TEM-1 gibi plazmid aracılı dar spektrumlu enzimleri kodlayan genlerdir. SHV grubu enzimler, geniş spektrumlu penisilinlere karşı dirençten sorumludur ve 60'tan fazla varyantı tespit edilmiştir.  $\beta$ -laktamaz enzimlerini kodlayan genlerin plazmidlerin üzerinde yerleşik olması direncin yayılabilmesi için önemli bir etmendir.<sup>7</sup> Yapılan epidemiyolojik araştırmaların sonuçlarına göre bir çok ülkede birbirinden farklı GSBL kodlayan gen ve mutantlarına rastlanmıştır. Türkiye GSBL varlığı bakımından önemli ülkelerden biridir.<sup>8</sup> Genel olarak GSBL üreten mikroorganizmalar florokinolon ve aminoglikozid grupları ile sülfonamid-trimetoprim gibi kombinasyonlara karşı da dirençlidir.<sup>9,10</sup> Bu nedenle, bu çalışmanın amacı antimikrobiyal dirençli E. coli'de GSBL'in karakterizasyonu ve GSBL ile diğer direnç tipleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesidir. Ayrıca,  $\beta$ -laktamaz enzimlerini kodlayan önemli genlerden biri olan SHV-1 geninin E. coli'deki varlığının moleküler yöntemle araştırılmasıdır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışma, sığır, keçi, koyun, köpek ve kedilerden izole edilerek oluşturulan koleksiyondan 112 adet E. coli izolatu seçilerek gerçekleştirildi.

### Disk difüzyon testi

Disk difüzyon yöntemi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'in önerdiği kriterlere göre yapıldı.<sup>11</sup> Mueller-Hinton Broth'da üretilen E. coli izolatlarının süspansiyonu 0.5 McFarland standardına göre hazırlandı. Standart süspansiyon Mueller-Hinton Agar'a (MHA) ekildi ve üzerlerine seftazidim (CAZ) (30  $\mu$ g), sefotaksim (CTX) (30  $\mu$ g), CAZ/klavulanik asit (CLA) (30/10  $\mu$ g) ve CTX/CLA (30/10  $\mu$ g) diskleri yerleştirildi. İnkübasyon sonrası oluşan zon çapları CLSI kriterlerine göre duyarlı (suscepti-

ble: S), orta duyarlı (intermediate: I) ve dirençli (resistant: R) olarak değerlendirildi. Kombinasyon zon çapları klavulanik asit içermeyen zon çaplarına göre 5 mm veya daha büyük olanlar GSBL pozitif olarak kabul edildi.

### Broth mikrodilüsyon testi

Broth mikrodilüsyon testi CLSI'in önerdiği kriterlere göre yapıldı.<sup>11</sup> CAZ ve CTX stok solüsyonları analitik standart kullanılarak 10:90 metanol/fosfat tamponlu suda (Phosphate Buffered Saline: PBS) hazırlandı ve 0.20  $\mu$ m şırınga filtreden (Corning®) geçirilerek sterilize edildi. Steril stok solüsyon kullanılarak 0.016-512  $\mu$ g/ml'lik seri dilüsyonlar hazırlandı. Son konsantrasyonu 0.008-256  $\mu$ g/ml olacak şekilde her bir mikropilaya kuyucuğuna 50  $\mu$ l antimikrobiyal ilaç dilüsyonu ve 50  $\mu$ l standart bakteri süspansiyonu konuldu. İnkübasyon sonrası bakterilerin optik dansiteleri mikropilaya okuyucuda (BioRad iMark) 595 nm'de ölçüldü ve üremenin olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlendi.

### DNA izolasyonu

Bakteri DNA'sı kaynatma yöntemine göre izole edildi. MHA'da üretilen bakteri kolonileri toplanarak 0.2 ml steril suda çözdürüldü. Elde edilen homojenat 99 °C'de 5 dk kaynatıldıktan sonra 1 dk buzda bekletildi. Santrifüj uygulandıktan (5 dk 13000 rpm) sonra üstte kalan bakteri DNA'sı moleküler testler için kullanılmak üzere -20 °C'de tutuldu.

### blaSHV geninin PCR amplifikasyonu ve görüntülenmesi

blaSHV geni amplifikasyonu için 5'-GGTTATGCGT-TATATTCGCC-3' (forward) ve 5'-TTAGCGTTGCCAGT-GCTC-3' (reverse) primerleri kullanıldı. PCR karışımı, 1'er  $\mu$ l primerler, 12.5  $\mu$ l 2xPCR Master Mix (OneTag), 2  $\mu$ l DNA ve 21  $\mu$ l moleküler su kullanılarak 50  $\mu$ l olacak şekilde hazırlandı. PCR işlemi sonrası elde edilen ürünler % 1'lik etidyum bromidli agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

## Sonuçlar

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre E. coli izolatlarının sadece 1/112'si (E. coli E87) CAZ ve CTX'e karşı dirençli bulundu. E. coli E87 CAZ/CLA ve CTX/CLA'ya karşı da dirençli olduğundan GSBL pozitif olarak tanımlandı.

Broth mikrodilüsyon test sonuçlarına göre CAZ ve CTX için en düşük MİK sırasıyla 0.016  $\mu$ g/ml ve 0.064  $\mu$ g/ml olarak tespit edildi. Hem CAZ hem de CTX için en yüksek MİK 256  $\mu$ g/ml olarak belirlendi. MİK dağılımlarına göre en yüksek frekans 29 izolatta CAZ için ve 35 izolatta CTX

için 2 µg/ml olarak bulundu. Klinik duyarlılık eşik değerlerine göre E. coli izolatlarının 18'i CAZ'a ve 32'si ise CTX'e karşı dirençli olarak nitelendirildi.

E. coli'de GSBL direncinden sorumlu genlerden biri olan blaSHV geni moleküler yöntemlerle araştırıldı ve bu gen hiç bir izolatta tespit edilemedi.

## Tartışma ve Sonuç

β-laktamaz direnci enfeksiyonların tedavisinde seçeneklerin azalmasına ve ekonomik kayıplara neden olabilir. Direnç zaman ve bölgesel farklılıklar gösterdiği için değişkenlikler düzenli olarak izlenmelidir.<sup>12,13</sup> Örneğin Türkiye'de GSBL pozitif izolat sayısı 2004-2007 yıllarında her yıl düzenli olarak izlenmiş ve pozitif izolat sayılarının oranları %3.8'den %17.2'ye yükselmiştir.<sup>14</sup> Yine poliklinik ve yatan hastalardan 2013-2015 yılları arasında izole edilen E. coli suşlarının yaklaşık %39'u GSBL pozitif bulunmuştur.<sup>15</sup> Bu çalışmanın sonuçlarına göre CAZ ve CTX'e karşı dirençli izolatların oranı sırasıyla %16.1 ve %28.6 olarak bulunmuştur. CAZ ve CTX dirençli izolatların oranları daha önce Türkiye'de yapılan diğer araştırmaların sonuçlarına göre daha düşüktür. Önceki araştırmalarda her iki antimikrobiyale karşı %32-37 oranında direnç tespit edilmiştir.<sup>16,17</sup> GSBL varlığının araştırılması için kullanılan testler ve elde edilen sonuçlar arasında tutarsızlıklar gözlenebilir. Genotipik olarak GSBL pozitif bulunan izolatlar duyarlılık testlerine göre negatif olarak nitelenebilir.<sup>18</sup> Örneğin AmpC pozitif olup duyarlılık testi sonuçlarına göre GSBL negatif olarak tanımlanmıştır.<sup>19</sup> Dolayısıyla tek başına CAZ ve CTX'e karşı dirençli olan E. coli izolat oranı yüksek olmasına rağmen izolatların negatif GSBL fenotipi göstermesi GSBL direncinden sorumlu olan diğer genlerin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

GSBL direncin sorumlu olan genler plazmid ve transpozonlar üzerinde konumlanmıştır. Bu nedenle mobil karakterdeki bu genetik fragmanlar bakteriler arasında GSBL direncin aktarımını kolaylaştırır. Eş zamanlı GSBL ve diğer bileşiklere karşı dirençli izolatların oranı %50'lere ulaşabilir.<sup>9</sup> Şahintürk ve ark.<sup>20</sup> yapılan araştırmada kullanılan ve çoklu ilaç direnç (Multidrug Resistance: MDR) fenotipi gösteren E. coli izolatları ile aynı klonlarda yer alan ve bu araştırmada kullanılan E. coli izolatlarında GSBL varlığının çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre MDR fenotipi gösteren E. coli izolatlarında GSBL direnç fenotipinin bulunma olasılığı çok düşüktür. Dolayısıyla MDR fenotipi, GSBL fenotipi ile her zaman ilişkili olmayabilir.

Sonuç olarak hayvanlardan izole edilen E. coli izolatlarında β-laktam grubu bileşiklere karşı direnç gözlenirse de GSBL

pozitif izolat sayısı çok düşük olabilir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre MDR pozitif izolatların GSBL fenotipine sahip olma olasılığı her zaman yüksek olmayabilir.

## Teşekkür

Bu araştırma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (KUAP(V)-2015/10) tarafından finanse edilmiştir.

## Kaynaklar

- 1) Livermore DM. Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8: 557-584.
- 2) Lee K, Lee WG, Uh Y. VIM- ve IMP- type metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean Hospitals. Emerg Infect Dis. 2003;9: 868-71.
- 3) Su Y, Yu CY, Tsai Y, Wang SH, Lee CH, Chu C. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2016; 49(6): 892-901.
- 4) Akova M, Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar ve klinik önemi. Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; 85-95.
- 5) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54: 969-76.
- 6) Kizirgil A, Yakupoğulları Y, Keçebaş AA, Seyrek A, Aşçı Toraman Z. GSBL üreten bakterilere karşı beta-laktamaz inhibitörü içeren kombinasyonların etkinliği. 11. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (30 Mart-3 Nisan 2003 İstanbul), Program ve Özet Kitabı'nda. İstanbul: Klimik Derneği, 2004:35.
- 7) Heritage J, Zali FH, Gascoyne-Birizi D, Hawkoy PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria, J Antimicrob. Chemother. 1999;44: 309-18.
- 8) Aydemir Ö, Terzi HA, Özözen EŞ, Köroğlu M, Altındış M. Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz üreten Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarında piperasilin/tazobaktam invitro etkinliği. Turkish J

Healt Sci. 2019;4(2): 118-127

isolates. J Clin Microbiol. 2009;47: 358-361.

- 9) Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella Spp.* suşlarının ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması”, 3. Türkiye EKMUD Kongresi. 2010.
- 10) Bush K, Bradford PA. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-producing pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020;26: 33(2).
- 11) CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Ninth Edition. Approved Standard M7-A9 2012.
- 12) Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. Front Microbiol. 2013;4: 258.
- 13) Marques C, Gama LT, Belas A, et al. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. BMC Vet Res. 2016;12 (1): 213.
- 14) Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, ve ark. Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella spp.* suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. ANKEM Derg, 2010;24: 34-41.
- 15) Şen P, Yula E, Demirkal T, Kaya S, Nemli SA, Demirci M. Solunum yollarından izole edilen genişlemiş spektrumlu ve indüklenebilir beta-laktamaz üreten bakterilerin direnç oranları. Ortadoğu Tıp Derg. 2017;170: 170-176.
- 16) Aydemir H, Yalçın A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretme ve antibiyotik direnç oranları. Klimik Derg, 2006;19: 63- 8.
- 17) Duman Y, Güçlüer N, Serinda AM, Tekerekoğlu MS. *Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal duyarlılık ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığı. Fırat Tıp Dergisi 2010;15: 197-200.
- 18) Robberts FJL, Kohner PC, Patel R. Unreliable extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2009;47: 358-361.
- 19) Coşkun S, Altanlar N. Sefoksitine dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti. Mikrobiyoloji Bülteni. 2012;46: 375-385.
- 20) Şahintürk P, Arslan E, Büyükcangaz E, et al. High level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from animals in Turkey is due to multiple mechanisms. Turk J Vet Anim Sci. 2016;40: 214–218.



# The Morphometric Examination of Head Area of Black Headed Gulls (*Larus Ridibundus*) from Marmara Region

● Ozan GÜNDEMİR<sup>1\*</sup>, ● Gülsün PAZVANT<sup>1</sup>, ● Nazan GEZER İNCE<sup>1</sup>

1 Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, 34320, Turkey

Received 2019-10-17 Accepted 2020-02-24

## Abstract

The Black-headed gull (*Larus ridibundus*), a gull species commonly seen on shores of Küçükçekmece lake located in Turkey's Marmara Region. This bird does not show sexual dimorphism because as it has monomorphic feather characteristics like other gull species.. In order to perform sex discrimination in gulls, the effective discriminant function analysis (DFA) method is used for the measurements based on the external morphology and determining the variables discriminating the two sex groups. The head morphological measurements and the body weights of 28 (14 males and 14 females) adult Black-headed gulls were obtained. One discriminant function was determined based on the results. The accuracy rate in two sexes was determined to be 82.1% (85.7% female, 78.6% male) using the formula we obtained as a result of the discriminant function analysis in which the head length, determined to be more significant compared to the other variables, was used. The aim of the study is to assess the sexual dimorphism in population of Black-headed gull and represent a reliable method to make a sex discrimination along with discriminant analysis.

Key words: Avian anatomy, Black headed gulls, head morphology, Marmara sea.

## Introduction

The Black-headed gull is a gull species commonly seen in wetlands. This bird species, that can drink salt water, is called with this name as its feathers growing on its head in winter months are black. They make their nests, mostly composed of dry sticks, on rocky areas and rooftops. This bird species, with a quite large population, are included in the least-concern species group.<sup>1,2</sup> They are also known to steal the food of other animals. They are among the most crowded gull groups seen in Marmara Region especially during the winter months. They may migrate due to bad weather conditions.<sup>2,3</sup>

It is estimated that 7.3-11 million Black-headed gulls live in an area of 10 million km<sup>2</sup> in the world. There are vari-

ous studies on this species that has a quite large population in Europe. It has been tried to calculate the number of the nests made by this bird species especially around Czech Republic and Poland and to determine their change within a year.<sup>4,5</sup> The nesting colonies around Netherlands and Belgium have been counted and the information on their inland and coastal colonies has been obtained.<sup>6</sup>

Turkey has an importance in terms of bird migratory routes due to its flora and fauna brought by its biogeographical properties.<sup>7</sup> It has been reported that 485 bird species have been determined in the recent counts performed within this context. Küçükçekmece Lake, located in the European side of Istanbul, is one of the centres where this count has been made.<sup>8</sup> In the count of winter water birds performed in 2018, it was reported that 22 species have been

\* Corresponding author: Ozan GÜNDEMİR, e-mail: ozan\_gundemir@hotmail.com, tel: +90 539 661 04 44

Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, 34320, Avcılar/Istanbul, Turkey



observed in this region and totally 22.022 birds were inhabiting in this region.<sup>9</sup> It was also reported in this count that black-headed gulls were among the 15 most abundant bird species.

As the gull species have monomorphic feather traits,<sup>10</sup> they do not exhibit sexual dimorphism. However, there are dimensional differences between males and females.<sup>11-13</sup> There are numerous studies in which an effective statistical assessment (discriminant function analysis-DFA) has been made in the measurements based on the external morphology and determining the variables discriminating the two sex groups, in order to perform sex discrimination in gulls. Also, it is known that the various dimensional measurements obtained external morphology vary in many species<sup>14-16</sup> and a separate discriminating function analysis is needed for each subspecies.<sup>12,13,17</sup>

The aim of the study; To assess the sexual dimorphism in Black Headed gull population in Küçükçekmece Lake and its surrounding located in Marmara Region and to present a reliable method to make the sex discrimination of black-headed gulls in the population, along with discriminant analysis.

## Materials and Methods

In the present study, a total of 28 dead adult Black-headed gulls including 14 males and 14 females which were brought to Istanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Science, were used. The present study was approved by Istanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Local Ethics Committee (Decision no: 13/02/2019-25832). It was known that these gulls were brought from Küçükçekmece Lake and its surrounding. This is a lake with low salinity located in 15 km west of Istanbul and at sea level. It is connected with sea and it is located on the important migratory routes for bird species (Fig. 1).

The weights of the gulls were measured using a 0.01 mg precision digital scale. The morphometric measurements were calculated in millimetres (mm) using a digital calliper. The head morphometric measurements of the Black-headed gulls were obtained from the specified points in the literature (Fig. 2),<sup>11,12,18,19,20</sup>

- 1-Nalopsi
- 2-Bill Length-1
- 3-Bill Length-2
- 4-Bill Length-3
- 5-Head Length
- 6-Bill Depth-1 (Gony)

7-Bill Depth-2

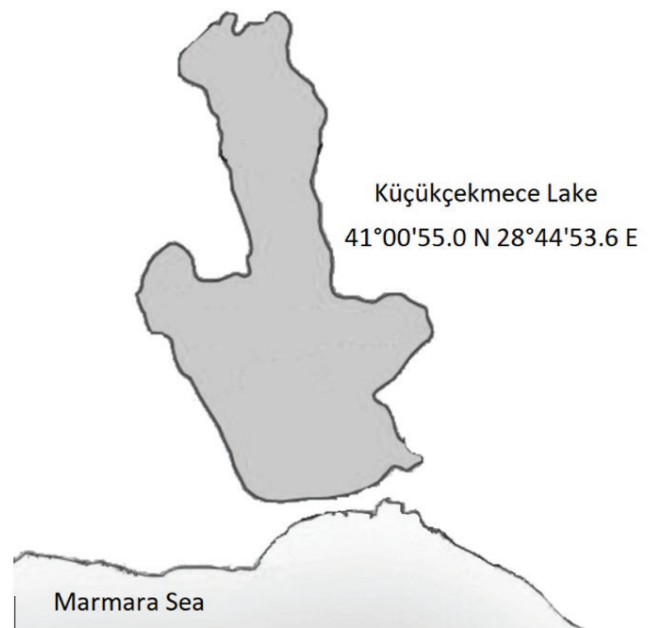


Figure 1. Location of Kucukcekmece Lake.

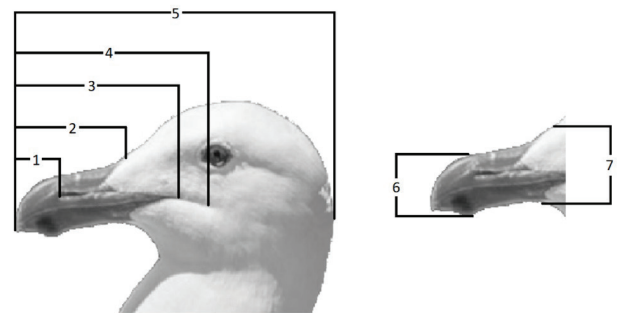


Figure 2. The morphometric measurements of the head of the Black-headed gull. 1: Nalopsi, 2: Bill length-1, 3: Bill length-2, 4: Bill length-3, 5: Head length, 6: Bill depth-1 (gony), 7: Bill depth-2.

After male and female individuals were determined by using the abdominal dissection method, they were grouped. The values of each group of Black-headed gulls were obtained separately and recorded into the computer. The results were assessed in the electronic environment.

The data used in the present study were assessed using Statistical Package for the Social Science (SPSS) for Windows 21 packaged software. The inter-sex groups were compared by applying “independent samples t-test” and the significant ones were specified.

The discriminant function analysis was performed in order to estimate sexes. The morphometric measurements, which were significant in the study, were used in the analysis. The significant variables were multiplied with their own

raw coefficients and a discriminant formula was formed. The explanatoriness was obtained by squaring canonical correlation. Those with high correlation coefficient ( $>0.7$ ) among all the variables were determined.

## Results

As a result of the analysis made on the morphometric measurements obtained from the heads of 28 Black-headed gulls which were collected from Küçükçekmece Lake and its surrounding and whose weights were measured, it was observed that the differences between the males and females in terms of nalopsi, head length and bill depth-1 were significant ( $P>0.05$ ). It was determined that the difference between the other morphometric characteristics, including weight, was not significant. Table 1 shows the mean values, standard deviations, and coefficient of variance of the measurement values of the gulls.

Table 1. Body measurement of male and female Blackhead Gulls from the Kucukcekmece Lake colony, Istanbul.

	Sexes	n	Mean (mm)	SD	t	CV (%)
<b>Nalopsi</b>	♂	14	16,16	1,12	<b>0,036*</b>	6,91
	♂	14	17,06	1,05		6,14
<b>Bill Length-1</b>	♂	14	50,37	2,82	0,242	5,59
	♂	14	51,78	3,41		6,59
<b>Bill Length-2</b>	♂	14	39,52	2,06	0,332	5,20
	♂	14	40,50	3,10		7,65
<b>Bill Length-3</b>	♂	14	33,20	1,89	0,101	5,69
	♂	14	34,62	2,48		7,15
<b>Head Length</b>	♂	14	80,01	2,94	<b>0,01*</b>	3,68
	♂	14	84,23	2,80		3,33
<b>Bill Depth-1</b>	♂	14	7,82	0,43	<b>0,024*</b>	5,54
	♂	14	8,26	0,54		6,51
<b>Bill Depth-2</b>	♂	14	9,65	0,71	0,139	7,33
	♂	14	10,07	0,76		7,52
<b>Weight</b>	♂	14	195,00	32,96	0,079	16,90
	♂	14	221,07	41,87		18,94

\* $P<0.05$

A high correlation was observed between head length and bill length-1 (0.76), between head length and bill length-3 (0.86), between head length and Nalopsi (0.78) and between bill length-1 and bill length-3 (0.71). It was determined that the covariance matrices were equal. The discriminant analysis was applied between the values that were significant in sex-estimation. Wilks Lambda and F values of the morphometric measurements were examined by discriminant analysis method. It was observed that the

head length, nalopsi and bill depth-1 (Gony) were statistically significant (Table 2). One discriminant function was determined using the results. It was observed that the head length was more significant compared to the other variables. The discriminant analysis provided the correct determination of 78.6% of the males and 85.7% of the females. It was observed that 82.1% of the analyses performed using the head length only was correct for both sexes.

Table 2. Wilks Lambda value and F value of the morphometric measurement data.

Morphometric measurements	Wilks' Lambda	F	Sig.
<b>Head length</b>	,633	15,078	,001
<b>Nalopsi</b>	,842	4,870	,036
<b>Bill Depth-1</b>	,818	5,774	,024

## The function equation for sex-determination:

In the validation of the discriminant function analysis performed with the females, it was observed that when the formula was applied for 14 females, the values of 12 individuals were under below zero and 11 of 14 individuals in the males had a result value above zero. It was determined that the analysis mean values were -0.734 in the females and 0.734 in the males.

## Discussion and Conclusion

Sex-determination in birds is an important prerequisite for the ecological and behavioural studies and the population of a region. However, sex-determination in the species with monomorphic feather character is a quite difficult, time-consuming and expensive procedure. But it is known that the morphological measurements in many poultry species are higher in males compared to females.

It was observed as a result of the analyses performed in the present study that only the head length was one of the distinctive features in sex-determination. It has been reported in the studies conducted with the gulls in the Baltic Sea, 19 Ivory gulls<sup>21</sup> and Western Europe population Black-headed gulls<sup>22</sup> that the bill depth is also a distinctive functional measurement as well as the head length. However, it has been stated that the gony depth continues to increase with increasing age after sexual maturity and therefore, this value may cause a mistake in DFA.<sup>23</sup> The effect of the other morphological characteristics on the discriminant function, in sex-determination, has been quite low in the other studies, as in the present study.

In another study, it was reported that the accuracy rate in the two sexes in 21 adult water birds using the wing and bill depths was 95% (100% females, 92% males).<sup>24</sup> However, as

the wing length increases with increasing age, it is obvious that using it for the birds, the age of which are not known, will not give correct results. In the present study, we used the morphometric characteristics of the heads of 28 adult Black-headed gulls. From these morphometric results, it was determined that the accuracy rate in two sexes was 82.1% (85.7% female, 78.6% male) using the formula we obtained as a result of the discriminant function analysis in which the head length was used.

The gulls used in the present study were included in adult age group. It was reported in the studies that the body weights become significant after 10 days and the body size became significant in the chick gulls between the two sexes after 15 days.<sup>25</sup> Also, in order to ensure that the use of body weight in DFA is effective in poultry, it should be measured in the same stage of the season and there is no variation among years.<sup>26</sup> In the present study, the highest CV value was observed in body weight. However, the fact that the body weight did not exhibit sexual dimorphism in Black-headed gulls was considered to be due to the use of the adult gulls in different seasons.

In a study conducted with the species of black-backed gulls, it was stated that the head length, bill depth and tarsal length were used as a distinctive feature. In this study, generalized linear modelling procedure was used as well as discriminant analysis.<sup>27</sup> In the mentioned study, the result demonstrating that all the morphometric measurements of the male gulls are higher compared to the female gulls is parallel with the present study. As the aim of the present study was only to reveal the distinctive features between male and female Black-headed gulls, it was considered that discriminant analysis method would be enough. It was also observed that this distinction could be performed with the head morphometric measurements together with the significant data obtained in the results.

There are many morphometric and morphological methods for sex-determination in veterinary anatomy studies. But, the morphometric measurements, which are the most effective in sex-determination, are used in the DFA applied in various gull populations and this is one of the best techniques used in the field studies. However, its usefulness should be tested in the other populations. Because applying a DFA analysis function obtained in a population to different populations may be risky as the possible morphological differences between the gulls with different origins. In the present study, it was aimed to obtain the reference information for sex-determination by examining the Black-headed gull species in Küçükçekmece Lake and its

surrounding. We think that we can perform sex-determination in accordance with the function obtained by using these outputs. These functions may provide a quick, easy, cheap and non-invasive way to identify male and female gulls in the ecological studies conducted on the sex-specific differences. This study, which also represents the morphometric characteristics of Black-headed gull species, provides reference values that can be used effectively in sex-determination using the external morphological structure in the further studies to be conducted in terms of taxonomy and in the field studies of ornithologists.



## References

1. Birdlife international 2016 species factsheet. *Larus ridibundus*. <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/Mew-Gull>. Accessed March 28, 2019.
2. Karabaş martı. <http://www.trakus.org>. Accessed March 28, 2019.
3. Karabaş martı. <https://evrimagaci.org/karabas-marti-chroicocephalus-ridibundus-5264>. Accessed March 28, 2019.
4. Musil P, Musilová Z, Fuchs R, et al. Long-term changes in numbers and distribution of wintering waterbirds in the Czech Republic, 1966–2008. *Bird Study*. 2011;58(4):450-460.
5. Poprach K, Machar I, Maton K. Long-term decline in breeding abundance of Black-headed Gull (*Chroicocephalus ridibundus*) in the Czech Republic: a case study of a population trend at the Chomoutov lake. *Ekológia (Bratislava)*. 2016;35(4):350-358.
6. Van Dijk JG, Stienen EW, Gerritsen S, et al. Reproductie van de Kokmeeuw in kust-en binnenlandkolonies. *Limosa*. 2009;82(1):13.
7. Yılmaz KT. Ecological diversity of the Eastern Mediterranean region of Turkey and its conservation. *Biodivers Conserv*. 1997;7(1):87-96.
8. Kılıç DT, Eken G. Türkiye'nin önemli kuş alanları 2004 güncellemesi. Doğa Derneği Ankara. 2004;74-100.
9. Kış ortası su kuşu sayımı 2018. Doğa koruma ve milli parklar genel müdürlüğü (İKGT 2010). [http://www.milliparklar.gov.tr/dosyalar/kosks\\_raporu2018.pdf](http://www.milliparklar.gov.tr/dosyalar/kosks_raporu2018.pdf). Accessed March 28, 2019.
10. Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. Handbook of the birds of the world. 1th ed. Barcelona: Lynx Edicions; 1996.
11. Galarza A, Hidalgo J, Ocio G, et al. Sexual size dimorphism and determination of sex in Atlantic yellow-legged gulls *Larus michahellis lusitanicus* from northern Spain. *Ardeola*. 2008;55(1):41-47.
12. Evans DR, Hoopes EM, Griffin CR. Discriminating the sex of laughing gulls by linear measurements (Identi-



- ficación del sexo en individuos de *Larus atricilla* utilizando medidas lineares). *J Field Ornithol.* 1993;472-476.
13. Evans DR, Cavanagh PM, French TW, et al. Identifying the sex of Massachusetts Herring Gulls by linear measurements. *J Field Ornithol.* 1995;66(1):128-132.
  14. Renner M, Davis LS. Sexing little penguins *Eudyptula minor* from Cook Strait, New Zealand using discriminant function analysis. *Emu.* 1999;99(1):74-79.
  15. Palomares, LE, Arroyo BE, Marchamalo J, et al. Sex- and age-related biometric variation of Black-headed Gulls *Larus ridibundus* in western European populations. *Bird Study.* 1997;44(3):310- 317.
  16. Aguirre JI, Arana P, Antonio MT. Testing effectiveness of discriminant functions to sex different populations of Mediterranean Yellow-Legged Gulls *Larus michahellis michahellis*. *Ardeola.* 2009;56(2): 281-286.
  17. Hammouda A, Selmi S. Morphometric sexing of Mediterranean Yellow-legged Gulls *Larus michahellis michahellis* breeding in the Gulf of Gabès, southern Tunisia. *Ostrich.* 2013;84(2):119-122.
  18. Bosch M. Sexual size dimorphism and determination of sex in Yellow-Legged Gulls (Dimorfismo sexual de tamaño y determinación del sexo en gaviotas patiamarillas). *J Field Ornithol.* 1996;67(4):534-541.
  19. Meissner W, Kośmicki A, Niemczyk A, et al. Development of sexual dimorphism and sexing of Baltic Herring Gull (*Larus argentatus argentatus*) in successive age classes. *Waterbirds.* 2017;40(1):24-33.
  20. İnce NG, Demircioğlu İ, Yılmaz B, et al. Martılar (Laridae spp.) cranium'un üç boyutlu modellemesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 2018;7(1): 98-101.
  21. Yannic G, Broquet T, Strøm H, et al. Genetic and morphological sex identification methods reveal a male-biased sex ratio in the Ivory Gull *Pagophila eburnea*. *J Ornithol.* 2016;157(3):861-873.
  22. Palomares LE, Arroyo B, Marchamalo J, et al. Sex- and age-related biometric variation of black-headed Gulls *Larus ridibundus* in Western European populations. *Bird Study.* 1997;44(3):310-317.
  23. Coolson JC, Duncan N, Thomas CS, et al. An age-related difference in the bill depth of Herring Gulls *Larus argentatus*. *Ibis.* 1981;123(4):499-502.
  24. Stermin AN, David A, Eilers A, et al. A better sex discriminator? Validity of sex-discriminating formulas in water rails *Rallus aquaticus* L., 1758 (Rallidae). *North-Western Journal of Zoology.* 2018;14(2):208-212.
  25. Jordi O, Arizaga J. Sex differences in growth rates of Yellow-legged Gull *Larus michahellis* chicks. *Bird study.* 2016;63(2):273-278.
  26. Taylor S, Jamieson IG: Determining sex of South Island saddlebacks (*Philesturnus carunculatus carunculatus*) using discriminant function analysis, *Notornis.* 2007;54(2):61-64.
  27. Hallgrímsson GT, Helgason HH, Palsdóttir ES, et al. Sexing adult and fledgling Lesser Black-backed Gulls from morphometrics. *Ringing Migr.* 2016;31(1):68-73.

# Effects of Lacosamide in Rats with Lipopolysaccharide Induced Hepatic Pathology

 Ozlem Ozmen<sup>1\*</sup>,  Volkan Ipek<sup>1</sup>

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

Received 2019-12-27 Accepted 2020-05-21

## Abstract

Bacterial lipopolysaccharides (LPS) generally increase the pathogenicity of the agent. This study aimed to examine the hepatic pathology and possible prophylactic effects of lacosamide (LCM) in a LPS-induced sepsis rat model. Overall, 24 1-year-old female Wistar Albino rats were divided into three groups: Group I (control), Group II (LPS group: 5 mg/kg LPS intraperitoneally, single dose), and Group III (LCM group: 40 mg/kg LCM intraperitoneally once daily for 3 days plus 5 mg/kg LPS 30 min after the last LCM treatment). Animals were euthanized 6 hours after LPS administration. Blood and liver samples collected during necropsy were analyzed biochemically, pathologically, and immunohistochemically. LPS caused a significant increase in serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, and alkaline phosphatase levels. Histopathological analysis revealed numerous neutrophil leucocyte infiltrations, slight hemorrhages in the liver, and degenerative or necrotic changes in hepatocytes. Increased expressions of malondialdehyde, C-reactive protein, heat shock protein-70, interleukin-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$  were observed in the LPS administered group. LCM ameliorated the biochemical, histopathological, and immunohistochemical findings. The present study results revealed that LCM ameliorated the LPS-induced liver damage in the rat models as evidenced by the biochemical and pathological findings.

Keywords: immunohistochemistry, lacosamide, lipopolysaccharide (LPS), liver, pathology.

## Introduction

Lipopolysaccharides (LPS) are large lipid- and polysaccharide-containing molecules found in the outer membrane of gram-negative bacteria.<sup>1</sup> LPS in some bacteria play a pivotal role in the pathophysiology of sepsis.<sup>2</sup> The intraperitoneal application of LPS is an experimental model for inducing systemic and hepatic inflammation in rodents. LPS may lead to dysfunction or failure of numerous organs, including the liver.<sup>3,4</sup> Acute phase proteins (APPs) are increased after LPS administration.<sup>5</sup> Endotoxemia is indicative of severity of the sepsis and the leading cause of death.<sup>6</sup>

Lacosamide (LCM) is a third-generation antiepileptic drug (AED) that was first approved in 2008 for use in adjunctive therapy for partial-onset seizures in adults. In 2014, LCM was approved by the FDA for use in monotherapy for partial-onset seizures. Unlike conventional sodium channel blockers, LCM stimulates the slow inactivation of sodium channels selectively. This action mechanism results in the stabilization of overexcitable neuronal membranes, inhibition of neuronal firing, and reduction of the long-term availability of channels without affecting the physiological function.<sup>7</sup> LCM does not stimulate or inhibit the cytochrome P450 enzyme. It has low protein-binding ability (< 15%) due to its numerous destruction mechanisms and

\* Corresponding author: Özlem ÖZMEN, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 15030, Istiklal Yerleskesi, Burdur, Turkey. Phone: +90 248 2132170, Fax: +90 248 2132001, e-mail: ozlemozmen@mehmetakif.edu.tr



does not interact with most clinically prescribed drugs.<sup>7,8</sup> The entry of calcium (Ca<sup>2+</sup>) into the cytoplasm is the most common signaling factor of cell damage in all cell types. The normal concentration of intracellular Ca<sup>2+</sup> is typically lower than that of extracellular Ca<sup>2+</sup>.<sup>9,10</sup> Therefore, excessive intracellular Ca<sup>2+</sup> may activate degradative processes and cause toxic effects in cells.<sup>9,11</sup> Similarly, sodium (Na<sup>+</sup>), which is the major cation in the extracellular space, can enter cells through various routes, especially during increased cell membrane permeability.<sup>12</sup> A significant increase in Na<sup>+</sup> is characteristic of tissue injuries.<sup>13,14</sup> The use of sodium channel blockers reduces both Na<sup>+</sup> entry and apoptotic neuronal death.<sup>14</sup> A well-known fact is that Na<sup>+</sup> influx into the cell is accompanied by chloride ions (Cl<sup>-</sup>) and water that can lead to acute cell swelling and damage.<sup>15</sup> The inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange attenuates ischemia-induced cell death.<sup>16,17</sup> The primary focus of pharmaceutical research has been to discover effective therapeutic approaches that target voltage-gated Na<sup>+</sup> channels.<sup>18</sup> LCM facilitates slow inactivation of sodium channels.<sup>7,8</sup>

Ameliorative effect of LCM on sepsis induced polyneuropathy previously reported.<sup>19</sup> But there is no knowledge about effect of LCM on LPS induced hepatic pathology. The objective of this study was to evaluate of the pathogenesis of sepsis and effect of LCM on LPS induced liver lesions. For this purpose, we evaluated the effects of LCM on liver via biochemical, histopathological and immunohistochemical findings in an *in vivo* rat model of sepsis.

## Materials and Methods

### Animals

The experiments were performed in accordance with the guidelines for animal research of the National Institutes of Health and were approved by the Committee on Animal Research at Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkey. Animals were maintained and used in accordance with the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in the Experimental Animal Center of Burdur Mehmet Akif Ersoy University (approval number:308).

Before the experiment health status of all rats were controlled by a veterinarian who was responsible for the animals. Overall, 24 1-year-old female Wistar Albino rats were used and divided into three groups: Group I (control) (0.1 ml/oral and *i.p.* saline, single dose), (n=8), Group II (LPS group: 5 mg/kg LPS intraperitoneally, single dose; (*i.p.* lipopolysaccharide, 500 mg flk, 048K4126, Sigma-Aldrich, USA),<sup>20</sup> (n=8), and Group III (LCM group: 40 mg/kg LCM

intraperitoneally once daily for 3 days and 5 mg/kg LPS 30 min after the last LCM treatment; (Benvida 100 mg tb/ Adeka Pharmacy, Turkey)<sup>19</sup>, (n=8). LCM was dissolved in normal saline. Four rats weighing 350–400 g were kept in a conventional cage, two cages used for each group, they placed in a temperature- (21–22 °C) and humidity (60 + 5%)-controlled room in which a 12:12 h light–dark cycle was maintained. All the rats were fed *ad libitum* a standard commercial chow diet (Korkuteli yem; Antalya, Turkey) and drinking water during the study. The rat numbers were minimized and total numbers of the animals selected for reliable statistical analysis. Animals were euthanized 6 hours after LPS administration. During necropsy, blood and liver samples were collected for biochemical, pathological, and immunohistochemical analyses.

### Biochemical Analysis

An autoanalyzer (Beckman Coulter AU680, California, USA) was used to determine the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (T. bil.), direct bilirubin (D. bil.), indirect bilirubin (I. bil.), albumin (ALB), and alkaline phosphatase (ALP) levels.

### Histopathological Examinations

During necropsy, the collected liver samples were fixed in 10% neutral formalin. Samples were then processed routinely using an automatic tissue processor equipment (Leica ASP300S, Wetzlar, Germany) and embedded in paraffin wax. Tissue sections of 5- $\mu$ m thickness were cut using a rotary microtome (Leica RM2155, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany); they were then stained with hematoxylin–eosin (H&E), placed on a mounting media and cover-slipped, and examined under a light microscope.<sup>21</sup>

### Immunohistochemical Examinations

For immunohistochemical analysis, liver samples were immunostained with antibodies raised against malondialdehyde (MDA) [Anti-Malondialdehyde antibody (ab6463)], C-reactive protein [Anti-C Reactive Protein antibody - Aminoterminal end (ab65842)], heat shock protein-70 (HSP-70) [Anti-Hsp70 antibody [5A5] (ab2787)], interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [Anti-IL1 beta antibody (ab2105)], and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [Anti-TNF alpha antibody (ab6671)] using the streptavidin–biotin technique. All primary serums and secondary antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK), and all primary antibodies used were 1/100 dilution. Primary antibodies were incubated for 60 min, and immunohistochemistry was performed using biotinylated secondary antibody and streptavidin–ALP conjugate. Ready-to-use kits [EXPOSE Mouse and

Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436)] were used as secondary antibodies and 3,3-diaminobenzidine as chromogen for 5 min. For negative controls, primary antiserum step was omitted. Histopathological and immunohistochemical examinations were performed on blinded samples. The percentage of immune-positive cells for each marker was determined by counting 100 cells in 10 different fields for every section under 40× objective magnification for all groups.<sup>22</sup> Statistical analyses were performed on the results obtained from the image analyzer. Morphometric analyses were performed using the Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japan).

**Statistical Analysis**

One-way analysis of variance test was used to determine significant differences among the groups. The groups were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis and Dunnett tests. Biochemical parameters that fit the normal distribution were obtained, and ANOVA, post-hoc LSD, Bonferroni, and Tukey tests were used to compare the groups. Differences among groups in the histopathological and immunohistochemical analyses were determined using the Bonferroni multiple comparison method. Calculations were made using the SPSS 20.0 program, and  $p < 0.05$  was set as the level of significance.

**Results**

**Biochemical Findings**

LPS caused a significant increase in the serum AST, ALT, T. bil., D. bil., I. bil., and ALP levels. Serum ALB levels were not affected by LPS administration. The results of biochemical analysis are summarized in Table 1.

	CON	LPS	LCM	P
AST (IU/L)	153.00±10.84	588.00±322.02	169.00±41.99	Con-LPS <0.01 Con-LCM (NS) LPS-LCM (NS)
ALT (IU/L)	70.25±16.14	178.75±54.63	35.33±7.91	Con-LPS<0.01 Con-LCM (NS) LPS-LCM (NS)
T.bil (mg/dL)	0.39±0.17	0.71±0.28	0.36±0.12	Con-LPS <0.05 Con-LCM (NS) LPS-LCM <0.05
D.bil (mg/dL)	0.020±0.002	0.040±0.001	0.015±0.002	Con-LPS< 0.05 Con-LCM (NS) LPS-LCM (NS)
I.bil (mg/dL)	0.37±0.17	0.67±0.26	0.35±0.12	Con-LPS<0.05 Con-LCM (NS) LPS-LCM <0.05
ALB (g/dl)	2.50±0.39	2.55±0.37	2.61±0.19	Con-LPS (NS) Con-LCM (NS) LPS-LCM (NS)
ALP (IU/L)	183.12±140.59	205.33±145.44	45.79±18.69	Con-LPS (NS) Con-LCM (NS) LPS-LCM (NS)

Table 1: Statistical analysis results of serum biochemical analysis and oxidative stress markers.

**Necropsy Findings**

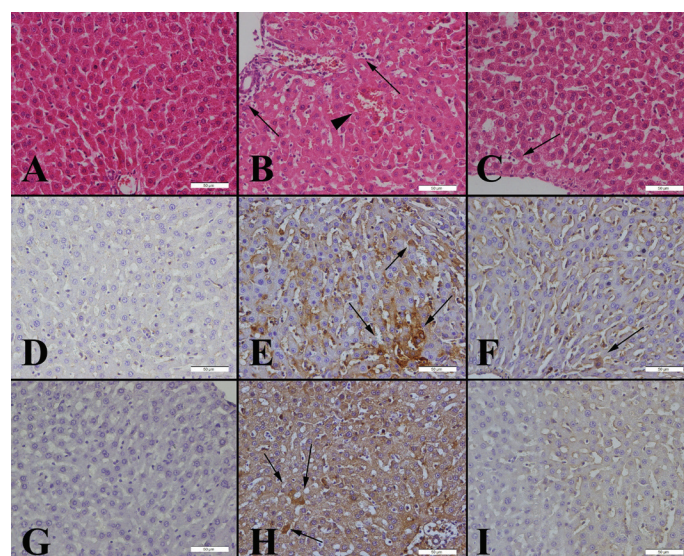
At necropsy hyperemia at the hepatic vessel were the marked finding in LPS group. There was no pathological

finding observed in CON and LCM group.

**Histopathological Findings**

Histopathological analysis revealed normal tissue architecture in the control group. Microscopic examination of the LPS group revealed marked hyperemia, inflammatory reaction comprised of neutrophil leucocyte, and hemorrhages in livers. Additionally, degenerations in some cells were the other common findings in this group. However, LCM treatment ameliorated the histopathological findings (Fig.1A-C).

Figure 1: Histopathological appearance of the livers. A) Normal histology in control group. H&E; B) Inflammatory reaction (arrows) and hemorrhage (arrow head) in the LPS group. H&E; C) decreased inflammatory reaction (arrow) in LCM-treated group. H&E. Bar = 50 µm. MDA immunoreaction in the livers. D) Negative immunoreaction in the control group. E) Increased immunoexpression (arrows) in hepatocytes in the LPS group. F) Slight immunoexpression (arrow) in the LCM-treated group. CRP immunoreactions in the livers. G) Negative immunoreaction in the control group. H) Increased immunoexpression (arrows) in hepatocytes in the LPS group. I) No immunoexpression in the LCM-treated group. Streptavidin–biotin peroxidase. Bars = 50 µm.



**Immunohistochemical Findings**

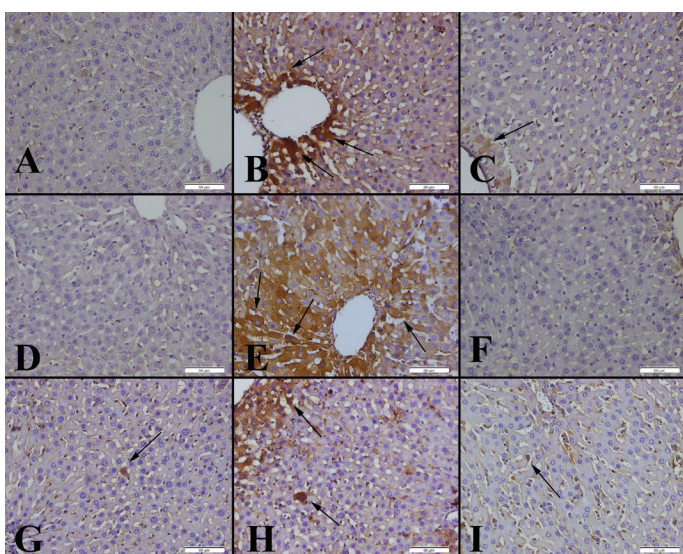
Immunohistochemical analyses revealed little or no expression of the investigated molecules in the control group. However, LPS caused an increase in the expressions of MDA, CRP, HSP-70, IL-1β, and TNF-α in hepatocytes and sinusoidal endothelial cells intracytoplasmically. The most significantly expressed markers were IL-1β, HSP-70, and TNF-α, respectively. Notably, LCM had an ameliorative effect and caused a statistically significant decrease in the expression of all markers (Figs. 1D-I, 2), (Table 2).



Markers	Control	LPS	LCM	P value
MDA	0.50±0.37	6.83±0.98	1.33±0.51	Con-LPS<0.001 Con-LCM (NS) LPS-LCM<0.001
CRP	1.25±0.36	11.83±2.15	2.07±0.36	Con-LPS<0.001 Con-LCM (NS) LPS-LCM<0.001
HSP-70	1.00±0.32	16.16±1.10	2.16±0.70	Con-LPS<0.001 Con-LCM (NS) LPS-LCM<0.001
IL1-β	0.50±0.26	27.33±1.52	2.16±0.70	Con-LPS<0.001 Con-LCM (NS) LPS-LCM<0.001
TNF-α	1.85±0.50	15.66±1.22	2.50±0.42	Con-LPS<0.001 Con-LCM (NS) LPS-LCM <0.001

Table 2: Statistical analysis of immunohistochemically positive cell numbers in the livers among the groups.

Figure 2: HSP-70 immunoreaction in the livers. A) Negative immunoreaction in the control group. B) Increased immunoreaction (arrows) in hepatocytes in the LPS group. C) Slight immunoreaction (arrows) in the LCM-treated group. IL-1β immunoreaction in the livers. D) No immunoreaction in hepatocytes in the control group. E) Increased immunoreaction (arrows) in hepatocytes in the LPS group. F) Negative immunoreaction in the LCM-treated group. TNF-α immunoreaction in the livers. G) Slight immunoreaction in hepatocytes (arrow) in the control group. H) Increased immunoreaction (arrows) in hepatocytes in the LPS group. I) Decreased immunoreaction (arrow) in the LCM-treated group. Streptavidin–biotin peroxidase. Bar = 50 μm.



## Discussion

This study revealed that LPS caused liver damage in rats and that the pathogenesis was associated with increased expression of IL-1β, HSP-70, TNF-α, CRP, and MDA. LCM can be a possible drug choice in the prevention of LPS-induced liver lesions.

LD50 dose of the LPS for rats previously reported as greater

than 20 mg/kg in normal rats at 24 hours.<sup>23</sup> The most preferred dose for single intraperitoneal injection of LPS is 5mg/kg for rats.<sup>24–26</sup> Dose selection were made based of the previous studies.

The induction of hepatic injury becomes evident because of the elevated levels of serum AST and ALT, which can be measured using standard clinical chemistry. Typically, when an inflammation-modifying substance needs to be tested, it is mandatory to analyze a control group simultaneously that only receives LPS and has no further intervention.<sup>4</sup> Bacterial LPS, also known as endotoxin or lipoglycan, is the major component of the outer surface of gram-negative bacteria.<sup>27</sup> Our study observed significant increases in the levels of serum ALT, AST, ALP, T. bil., D. bil., and I. bil. in the LPS group. However, LCM treatment attenuated the biochemical results.

LPS activates Toll-like receptor 4 and eventually nuclear factor-kappa B (NF-κB) mechanism followed by the release of inflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1α/β, IL-6, IL-12, IL-18, and GM-CSF.<sup>4</sup> Oxidative stress is also a well-known mechanism of LPS-induced hepatic injury which is supported by reactive oxygen species.<sup>28</sup> A large proportion of proinflammatory mediators comprising cytokines are responsible for metabolic changes associated with cellular injury.<sup>29</sup> Cytokines function as mediators of the immune and acute phase responses. TNF-α, IL-1β, and IL-6 are the major mediators of acute phase response in humans.<sup>30</sup> Additionally, IL-6 functions as an endogenous pyrogen that stimulates the immune system and, in conjunction with TNF-α, can stimulate the synthesis of acute phase proteins, such as CRP from hepatocytes.<sup>31</sup> The immunohistochemical examination of our study revealed substantially increased expression of MDA, CRP, HPS-70, IL-1β, and TNF-α. However, LCM was observed to be effective in reducing both inflammatory and oxidative damage markers. We believe that the most suitable markers to evaluate LPS-induced hepatic damage are IL-1β, HSP-70, TNF-α, CRP, and MDA.

Despite several studies have been focused on this subject, the mechanism of LPS-induced endotoxemia is still not completely clear. It has been suggested that oxygen-derived radicals are generated during endotoxic shock that induce tissue injury. Lipid peroxidation may then be initiated, inducing further tissue damage.<sup>28–32</sup> Lipid peroxidation with unsaturated lipids generates a wide variety of oxidation products. Notably, the primary products of lipid peroxidation are lipid hydroperoxides. The secondary and most mutagenic product formed during lipid peroxidation

is MDA.<sup>33</sup> A majority of the toxic effects of LPS are mediated by proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , that are produced by monocytes and macrophages.<sup>34</sup> TNF- $\alpha$  reportedly plays a central role in the pathology of LPS-induced lethality.<sup>3</sup> Furthermore, CRP is an acute phase reactant that is synthesized and released by various cells, including hepatocytes in response to microbial infection, tissue injury, and immunomodulatory stimuli.<sup>35</sup> Additionally, HSPs are a group of stress proteins that are actively synthesized when macrophages are exposed to bacterial toxins.<sup>36</sup> HSPs are present in almost all eukaryotic cells, including hepatocytes, and are transiently overexpressed when cells are exposed to heat shock.<sup>37</sup> HSP-70 is an abundant and well-conserved, stress-inducible protein that plays a vital role in the cellular stress response and enables organisms to survive multiple environmental stresses. It is constitutively expressed and is essential in the normal functioning of cells.<sup>38</sup> Notably, when cells are exposed to a stressor, the rapid increase in HSP-70 levels reportedly protects cells from the harmful effects of the stressor.<sup>39</sup> The protective effect of HSP-70 has been demonstrated in a variety of cells, tissues, and organs.<sup>39,40</sup> In this study, we examined LPS-induced liver toxicity and the effect of LCM on acute sepsis through biochemical, histopathological, and immunohistochemical methods. We identified that MDA, CRP, HSP-70, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  play important roles in LPS-induced hepatic pathology. Liver histopathology revealed that hyperemia, hemorrhage, inflammatory reaction mainly comprising neutrophil accumulation, and necrotic changes in hepatocytes in the LPS group indicated classic signs of hepatic damage. Increased immunoeexpression of the markers was indicative of lipid peroxidation and acute phase reaction, which are critical factors of LPS-induced hepatic damage.

Few reports have suggested an increase in enzymes and toxicity in the liver following LCM treatment<sup>41-43</sup> with hepatic impairment considered to be a severe side effect of LCM.<sup>44</sup> However, in all these cases, LCM was administered for a longer term with multiple doses. Conversely, our results suggested that three doses of LCM can produce ameliorative effects in liver damage. Unfortunately, the mechanism of this effect is elusive. Nonetheless, the possibility of an interaction of LCM—a sodium channel inhibitor—with the epithelial sodium channels of hepatocytes via an unknown mechanism is suggested. Notably, in rat and mice, the brain and liver intestine sodium channels (BLINaC) are predominantly expressed in the brain, liver, and intestine.<sup>45</sup> However, the functions of these channels remain unknown.<sup>46</sup> Therefore, we suggest that LCM affects these channels to prevent sodium influx in hepatocytes that can cause degenerative changes and decrease inflammatory

and free radical injury via an unknown mechanism.

In our study, we used only 40 mg/kg for three days followed by one dose of LPS (5 mg/kg) and obtained unexpected results because the LCM improved the liver condition. Chronic nature of epilepsy necessitates lifelong use of AEDs. Generally, epilepsy cannot be controlled with a single AED in more than 30% of patients; therefore, multiple AEDs are needed.<sup>7</sup> New AEDs, such as levetiracetam and LCM, are more suitable options for patients with hepatic impairment compared with the older AEDs<sup>46-47</sup> because these drugs are less likely to exacerbate liver damage. Moreover, these drugs show low or no serum protein-binding capacity,<sup>47</sup> lower drug-to-drug interaction, and minimal toxicity risk.<sup>5,48</sup> LCM is metabolized by the CYP450, 2C19 system, but its metabolites are inactive. Its protein-binding capacity is lower than 15%, and approximately 40% of it is excreted in the urine. LCM is also a safe choice because of its linear pharmacokinetics.<sup>46</sup> Although the long-term usage of LCM may produce liver damage, we observed that three doses of LCM did not induce liver injury but surprisingly ameliorated serum biochemical levels of liver enzyme and improved histopathological and immunohistochemical findings. We also reported that ameliorative effects of LCM on LPS induced neuro inflammation and urogenital system damage by using related organs of these study rats recently.<sup>49,50</sup>

Therefore, to conclude, three doses of LCM can prevent LPS-induced acute liver damage by suppressing both inflammatory and oxidative injuries through an unknown mechanism. However, further studies are warranted to understand this mechanism entirely. However, the possibility of exacerbation of liver damage must be considered when using this drug for a longer duration.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

## References

1. Wolff A. Uber Grundgesetze der Immunitat. *Bakteriol.* 1904;37:390-7.
2. Raetz CR. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol.* 1993 Sep;175(18):5745-53.
3. Nowak M, Gaines G, Rosenberg J, Minter R, Bahjat F, Rectenwald J, et. al. LPS-induced liver injury in d-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF- $\alpha$  and the TNF-p55 receptor. *Am J Physiol - Regul Integrative Comp Physiol.* 2000; May; 278(5):R1202-9.
4. Hamesch K, Borkham-Kamphorst E, Strnad P, Wei-

- skirchen R. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice. *Lab Anim*. 2015 Apr 2;49(1-suppl):37–46.
5. Haziot A, Lin XY, Zhang F, Goyert SM. Cutting edge: The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent. *J Immunol*. 1998 March 15;160 (6): 2570-2.
  6. Exley AR, Leese T, Holliday MP, Swann RA, Cohen J. Endotoxaemia and serum tumour necrosis factor as prognostic markers in severe acute pancreatitis. *Gut*. 1992 Aug 1;33(8):1126–8.
  7. Cawello W. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of lacosamide. *Clin Pharmacokinet*. 2015 Sep 9;54(9):901–14.
  8. de Biase S, Gigli GL, Valente M, Merlino G. Lacosamide for the treatment of epilepsy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014 Mar 30;10(3):459–68.
  9. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):259–68.
  10. Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006 Feb;1(1):405–34.
  11. Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee J-M, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: The roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma*. 2000 Oct;17(10):857–69.
  12. Nikolaeva MA, Mukherjee B, Stys PK. Na<sup>+</sup>-dependent sources of intra-axonal Ca<sup>2+</sup> release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J Neurosci*. 2005 Oct 26;25(43):9960–7.
  13. Ballard-Croft C, Carlson D, Maass DL, Horton JW. Burn trauma alters calcium transporter protein expression in the heart. *J Appl Physiol*. 2004 Oct;97(4):1470–6.
  14. Banasiak K., Burenkova O, Haddad G. Activation of voltage-sensitive sodium channels during oxygen deprivation leads to apoptotic neuronal death. *Neuroscience*. 2004 Jan;126(1):31–44.
  15. Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci*. 1995 Feb;18(2):58–60.
  16. Vornov JJ, Thomas AG, Jo D. Protective effects of extracellular acidosis and blockade of sodium/hydrogen ion exchange during recovery from metabolic inhibition in neuronal tissue culture. *J Neurochem*. 1996 Dec;67(6):2379–89.
  17. Mentzer RM, Lasley RD, Jessel A, Karmazyn M. Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):S700-8.
  18. Baptiste DC, Fehlings MG. Update on the treatment of spinal cord injury. In: *Progress in brain research*. 2007. p. 217–33.
  19. Solmaz V, Aksoy D, Yilmaz M, Eser E, Erbas O. Demonstration of ameliorative effect of lacosamide: in a rat model of sepsis-induced critical illness polyneuropathy. *Neurol Res*. 2015 Sep;37 (9):797–802.
  20. Samuvel D, Shunmugavel A, Singh A, Singh I, Khan M, S-Nitrosoglutathione ameliorates acute renal dysfunction in a rat model of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Pharm Pharmacol*. 2016 Oct; 68 (10):1310–9.
  21. Luna G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute . of Pathology*. 3rd editio. New York: McGraw Hill Book Co; 1968. 32–34 p.
  22. Haligur M, Topsakal S, Ozmen O. Early degenerative effects of Diabetes mellitus on pancreas, liver and kidney in rats; An immunohistochemical study. *Exp Diabetes Res*. 2012; Article ID 120645, 10 pages, doi:10.1155/2012/120645.
  23. Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, et al. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology*. 1999 Nov;30(5):1198–205.
  24. Li G, Liu Y, Tzeng N, Cui G, Block ML, Wilson B, et al. Protective effect of dextromethorphan against endotoxic shock in mice. *Biochem Pharmacol*. 2005 Jan 15;69(2):233–40.
  25. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong J-S, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr 1;55(5):453–62.
  26. Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, et al. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- $\alpha$  and IL-18. *J Neuroinflammation*. 2012 Dec 29;9(1):671.
  27. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*. 2003 Nov 14;338(23):2431–47.
  28. Ajuwon OR, Oguntibeju OO, Marnewick JL. Amelioration of lipopolysaccharide-induced liver injury by aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract via inhibition of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Dec 13;14(1):392.
  29. Hill AG, Hill GL. Metabolic response to severe injury. *Br J Surg*. 1998 Jul;85(7):884–90.
  30. Leung KL, Lai PB, Ho RL, Meng WC, Yiu RY, Lee JF, et al. Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann Surg*. 2000 Apr;231(4):506–11.
  31. Wortel CH, van Deventer SJ, Aarden LA, Lygidakis NJ,



- Büller HR, Hoek FJ, et al. Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. *Surgery*. 1993 Sep;114(3):564–70.
32. Requentina PJ, Oxenkrug GF. Differential effects of lipopolysaccharide on lipid peroxidation in F344N, SHR rats and BALB/c mice, and protection of melatonin and NAS against its toxicity. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;993:325–33; discussion 345–9.
  33. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81–128.
  34. Lynn WA, Cohen J. Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin Infect Dis*. 1995 Jan;20(1):143–58.
  35. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Macrophage Conditioned Medium Induces the Expression of C-Reactive Protein in Human Aortic Endothelial Cells. *Am J Pathol*. 2005 Apr;166(4):1265–71.
  36. Teshima S, Rokutan K, Takahashi M, Nikawa T, Kishi K. Induction of heat shock proteins and their possible roles in macrophages during activation by macrophage colony-stimulating factor. *Biochem J*. 1996 Apr 15;315 ( Pt 2(Pt 2):497–504.
  37. Rai R, Richardson C, Flecknell P, Robertson H, Burt A, Manas DM. Study of Apoptosis and Heat Shock Protein (HSP) Expression in Hepatocytes Following Radiofrequency Ablation (RFA). *J Surg Res*. 2005 Nov;129(1):147–51.
  38. Hartman D, Gething MJ. Normal protein folding machinery. *EXS*. 1996;77:3–24.
  39. Wang J, Wei Y, Li X, Cao H, Xu M, Dai J. The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carrasius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2007 Apr;145(3):350–62.
  40. Padmini E, Usha Rani M. Impact of seasonal variation on HSP70 expression quantitated in stressed fish hepatocytes. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*. 2008 Nov;151(3):278–85.
  41. Ben-Menachem E, Biton V, Jatuzis D, Abou-Khalil B, Doty P, Rudd GD. Efficacy and Safety of Oral Lacosamide as Adjunctive Therapy in Adults with Partial-Onset Seizures. *Epilepsia*. 2007 Jul;48(7):1308–17.
  42. Gutiérrez-Grobe Y, Bahena-Gonzalez JA, Herrera-Gomar M, Mendoza-Diaz P, García-López S, González-Chon O. Acute Liver Failure Associated with Levetiracetam and Lacosamide Combination Treatment for Unspecified Epileptic Disorder. *Case Rep Emerg Med*. 2013;2013:1–3.
  43. Sunwoo J-S, Byun J-I, Lee SK. A case of lacosamide-induced hepatotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2015 Jun 1;53(06):471–3.
  44. Zaccara G, Perucca P, Loiacono G, Giovannelli F, Verrotti A. The adverse event profile of lacosamide: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Epilepsia*. 2013 Jan;54(1):66–74.
  45. Wiemuth D, Gründer S. A single amino acid tunes Ca<sup>2+</sup> inhibition of brain liver intestine Na<sup>+</sup> channel (BLINaC). *J Biol Chem*. 2010 Oct 1;285(40):30404–10.
  46. Asconapé JJ. Use of antiepileptic drugs in hepatic and renal disease. In: *Handbook of clinical neurology*. 2014. p. 417–32.
  47. Alvarez V, Rossetti AO. Monotherapy or Polytherapy for First-Line Treatment of SE? *J Clin Neurophysiol*. 2016 Feb;33(1):14–7.
  48. Vidaurre J, Gedela S, Yarosz S. Antiepileptic Drugs and Liver Disease. *Pediatr Neurol*. 2017 Dec;77:23–36.
  49. Savran M, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Asci S, Kaynak M. The impact of prophylactic lacosamide on LPS-Induced neuroinflammation in aged rats. *Inflammation*. 2019 Oct; 42(5): 19, 1913–25.
  50. Günyeli, I, Saygın M, Ozmen O. Overall systematic approach to sepsis damages on urogenital tissues: protective power of lacosamide. *Arch Gynecol Obstet*. 2019 Oct; 300(4): 941–55.



## A Phylogenetic and Genotyping Study of Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV-4) in Turkey

 **B. Taylan KOÇ**

Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University,  
Işıkli, Efeler-Aydın, 09016, TURKEY

Received 2019-10-31 Accepted 2020-05-26

### Abstract

Infertility and reproductive infections are the huge problems for the dairy management throughout the world. Bovine herpesviruses act an enormous role in these complicated problems. Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) is the most outstanding herpesvirus causing genital and uterine tracts infections among other reproductive viral agents, however, Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV-4) is also responsible in terms of similar symptoms and diseases. The main aims of the study are both to investigate the underlying potential presence of BHV-4 in subclinical uterine tract infection, and both to perform molecular and recombination analyses. A herd including 25 repeat breeder cows were investigated by BHV-4. Two out of them were determined BHV-4 infected after a series of Polymerase Chain Reactions (PCRs) tests which able to amplify partial Glycoprotein B (gB) and Thymidine Kinase (TK) gene regions. Obtained sequences were analyzed by using phylogenetic and recombinational software, and two Maximum Likelihood (ML) tree have been constructed. To results, novel Turkish BHV-4 sequences fell into Genotype I in both constructed Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees, however, no recombination evidence has been observed in relevant software. This report is one of the rare genotyping studies on BHV-4 from Turkey. This study showed that Turkish BHV-4 strains, as molecular, were highly probable to originate from European strains and might be observed in different clinical reflections. This suggests that BHV-4 should be deeply investigated by further molecular techniques and included in diagnostic panels for reproductive viruses.

**Keywords:** Reproductive Infection, Bovine herpesvirus Type 4 (BHV-4), Repeat-breeder, Infertility, Genotyping, Turkey

### Introduction

Bovine herpesviruses (BHV)s are prominent viral agents of cattle all around the world, which mainly causes subclinical cases including respiratory and reproductive infections. Bovine Herpesvirus Type 4 (BHV-4) has been thought to predominantly cause genital diseases rather than other herpesviruses, although it was first isolated from the respiratory tract of a calf with relevant symptoms.<sup>1,2</sup> BHV-4 taxonomically belongs to genus Rhadinovirus, subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae.<sup>3</sup>

Pathogenetic mechanism of BHV-4 and its reflection on the clinical presentation is not widely known according to previous reports.<sup>1,4,5</sup> In performed studies so far, it has been emphasized that the vast majority of BHV-4 cases has trigger subclinical infections which leading infertility problems and losses of milk yield.<sup>1,3,5</sup> Genetic variability also might induce different pathogenesis, clinical diseases and latency determination, thus, molecular investigation of BHV-4 in infertile, repeat breeder animals have crucial importance in terms of dairy health.<sup>1,4-7</sup>

BHV-4 has double-stranded DNA in length of 144 kb

\* Corresponding author: B.T. Koç, E-mail: btkoc@adu.edu.tr, Tel: +90 256 2470700, Postal Adress: Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Işıkli, Efeler-Aydın, 09016, TURKEY



which has many critical gene regions for protein expression. Glycoprotein B (gB) and Thymidine Kinase (TK) are most significant gene regions and characterized by various molecular studies.<sup>6-8</sup> gB is more conserved gene region rather than TK, accordingly, has been used for general diagnosis protocol.<sup>6,9</sup> TK is preferred for molecular and phylogenetic studies, because of its close relationship with the host cell and being prone to molecular genetic changes.<sup>4,6</sup> Three main genotypes based on TK, therefore, have been proposed by many researchers who have recently performed molecular and phylogenetic analyses in their papers.<sup>4,6,7,10</sup> Genotype I has included Movar (33/63), reference strain from Europe, in which other sequences have been also Movar-like strains. Likewise, DN-599, reference strain of America, has fell into Genotype II which has other DN-599 like BHV-4 sequences. Genotype III has been consisted of some Latin America BHV-4 strains including MGArom, MGA696, etc.<sup>4,6,7,10</sup>

In Turkey, many serological investigations on BHV-4 have been performed, however, studies are limited and which genotypes have been circulated is unknown.<sup>11-17</sup> In this study, therefore, it was aimed to investigate the potential presence of BHV-4 in a dairy cattle herd with reproductive problems (repeat breeding, infertility, postpartum infection). It was additionally intended to elucidate current molecular evolutionary status by phylogenetic and recombination analysis.

## Materials and methods

### Materials

Uterine tract swabs were taken from 25 animals which have been consistently possessed reproductive problems (repeat breeding, infertility, postpartum infection) in a dairy herd. This small family dairy management had 67 cattle and located in Bozdogan, Aydin, province of the Southern Aegean region of Turkey. The ages of sampled animals ranged from two to five years that had reproductive problems in their history. Animals were only vaccinated with vaccines applied by public veterinary services. Vaccines against BVDV, BLV, and, BHV-1 have not included in the mentioned vaccination program. All animals, except one, were healthy-looking in the clinical observation. The mentioned animal had some clinical signs, which were hemorrhagic lesions around the mouth and muzzle area, anorexia, dehydration, diarrhea, pyrexia (Figure 1). Whole blood sample and nasal swab were also collected from this animal. This herd had been investigated by PCRs in a private diagnostic laboratory in terms of various reproductive infection agents including Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV),

Bovine Herpesvirus Type-1 (BHV-1), Bovine Leukemia Virus (BLV), and all of them had been reported negative.



Figure 1: Clinical symptoms in the cow, named as TR/BHV-4/2018 Bozdogan2. [A] Nasal discharge [B] Hemorrhagic area on muzzle.

### Methods

Viral genome was isolated by Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1) method modified from Chomczynski and Sacchi<sup>18</sup>. Primers sets in PCR that could amplify partial gB and TK genes were modified based on reports of Wellenberg et al.<sup>19</sup> and Verna et al.<sup>6</sup>, respectively. PCR protocols were presented as follows: initial denaturation (95°C 5min); amplification (94°C 30s, variable to T<sub>m</sub> of primer pairs 30s, 72°C 50s) for 35 cycles; final extension (72°C 7min). Purified amplicons were sequenced by Sanger method. Sequences were cleaned from noisy and weak traces by using a software (Mega 10.0)<sup>20</sup>. To confirm the information of negativity of BHV-1, BLV and BVDV, we also performed PCR tests by each relevant primer pairs that globally used.<sup>21-23</sup>

Obtained sequence data batch were submitted to GenBank database by interface BankIt. Accession numbers have been assigned.

(TR/BHV-4/2018/Bozdogan1-TK → MN173774; TR/BHV-4/2018/Bozdogan2-TK → MN173775; TR/BHV-4/2018/Bozdogan1-g(B) → MN173776; TR/BHV-4/2018/Bozdogan2-g(B) → MN173777) and were presented in phylogenetic trees (Figure 2; 3). For phylogenetic analysis, relevant reference strain sequences were downloaded from GenBank. To construct maximum-likelihood phylogenetic tree, Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) and Tamura 3 (T92) models were determined as best model for gB and TK genes, respectively. 1000 bootstrap replicates were chosen for optimal calculation during tree construction.

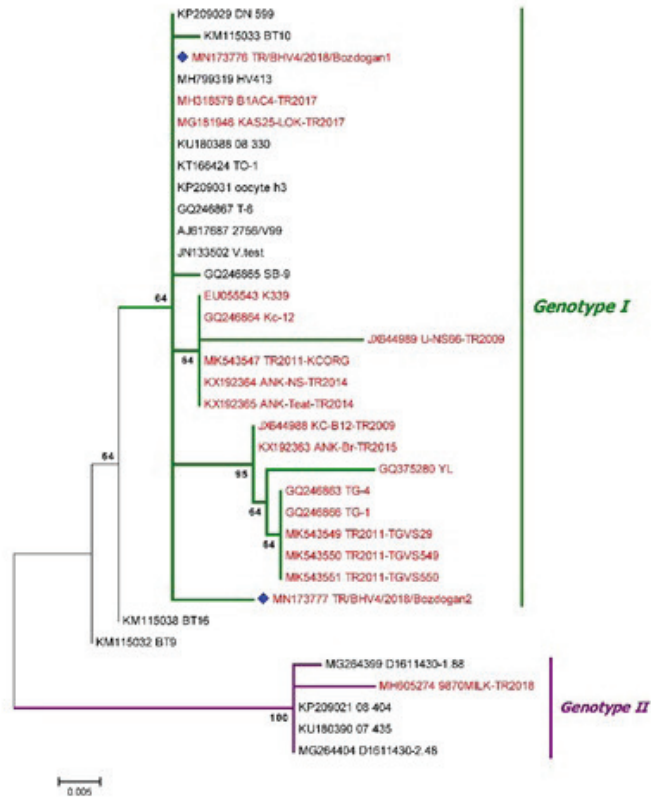


Figure 2: Maximum Likelihood tree based on glycoprotein B (gB) were constructed using Hasegawa-Kishino-Yano model with 1000 bootstrap replicates. All Turkish sequences were determined in red-colored and novel Turkish sequences have been also marked with “♦”. All Turkish sequences except one fell into Genotype I. TR/BHV-4/2018/Bozdogan2 distantly localized to TR/BHV-4/2018/Bozdogan1 in this genotype.

Recombination detection program, RDP4, was used to reveal potential recombination in gB and TK gene. Herein, also, the distance plot algorithm has been run with representative strains from genotypes and obtained sequences in this study (Figure 4).

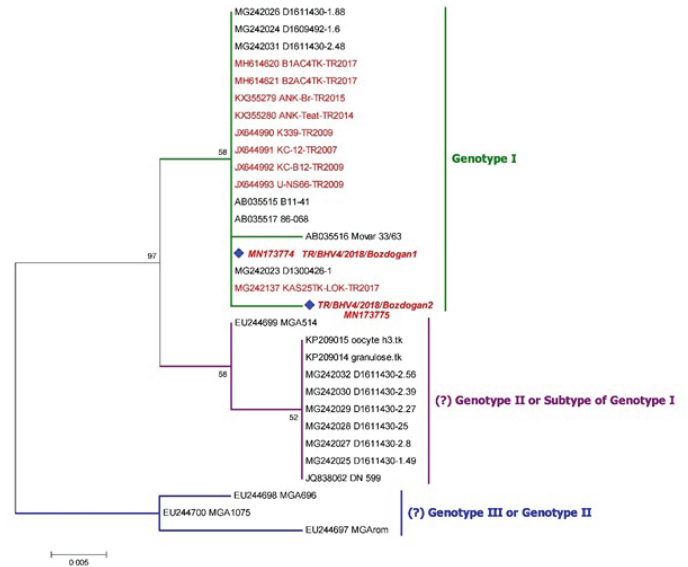


Figure 3: Maximum Likelihood tree based on thymidine kinase (TK) were constructed using Tamura 3 model with 1000 bootstrap replicates. All Turkish sequences were determined in red-colored and novel Turkish sequences have been also marked with “♦”. Three main genotypes have occurred and all Turkish sequences monophyletically localized to each other into Genotype I.

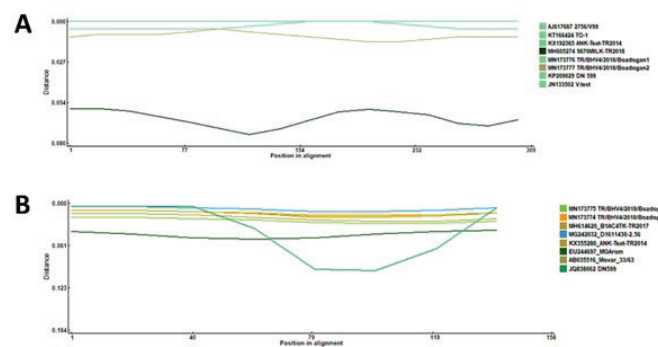


Figure 4: Distance plot analysis based on both glycoprotein B (gB) and thymidine kinase (TK) in RDP4. [A] Distance plot based on glycoprotein B (gB) [B] Distance plot based on thymidine kinase (TK)

## Results

BHV-1, BVDV and BLV were found to be negative in all samples. Two out of twenty-five animals have been found BHV-4 positive, and both gene amplicons were available for phylogenetic and recombination assessment. Only vaginal swabs were found positive, on the other hand other samples (nasal and blood samples) were negative. After sequence analysis, obtained sequences were named as TR/BHV-4/2018/Bozdogan1 and TR/BHV-4/2018/Bozdogan2. Both sequences (Bozdogan1 and Bozdogan2) were found 95%-99.7% identical to other BHV-4 sequences in GenBank database by using BLAST interface.

In phylogenetic assessment, both sequences monophyletically located on ML trees.



In gB ML unrooted tree, TR/BHV-4/2018/Bozdogan1 located closer to prior Turkish and prominent reference sequences, whereas TR/BHV-4/2018/Bozdogan2 has drawn a separated branch in Gen-otype 1 (Figure 2). TK gene-based unrooted ML tree has generated similar tree topology, but this tree was separated into three major genotypes (Figure 3).

In RDP4, there was no recombinational evidence between new and reference sequences, available in GenBank, based on both gB and TK region. No unique changes have been found in toggle translation, however, distance plot based on nucleotide identities has indicated nucleotide differences (Figure 4). TR/BHV-4/2018/Bozdogan1 had no shown any clinical symptoms, while TR/BHV-4/2018/Bozdogan2 had clinical symptoms including hemorrhagic lesions around the mouth and muzzle area, anorexia, dehydration, diarrhea, pyrexia.

## Discussion

BHV-4 is one of the viral agents which has been substantially assumed to trigger reproductive problems in cattle all around the world. Despite this assumption, a wide variety of clinical symptoms including dermatitis, mastitis, vasculitis, respiratory tract disorders, has also been declared in previous reports by some researchers.<sup>1-7,11-17</sup> One of them, a case report by Bellino et. al<sup>4</sup> claimed that BHV-4 might likely to be the reason for Dermatitis-Pyrexia-Hemorrhagic Syndrome (DPHS) in a cow with relevant symptoms. Intriguingly, TR/BHV-4/2018/Bozdogan2 similarly had a many of mentioned symptoms in the cow with DPHS although blood and nasal swab samples were negative in PCR test. This leads to be thought that BHV-4 proportionally causes reproductive problems rather than other symptoms as it stated before.<sup>1,7,11,12,15-17</sup> Pathoclinical linking remains to be elucidated by further detailed analysis. BHV-4 might also be a triggering factor providing to be occurred relevant symptoms by major subclinical diseases. Therefore, exhibiting of the accurate mechanism for BHV-4 can be provided by various pathoclinical studies.

Existence of a wide variety of clinical symptoms of BHV-4 have leads to be investigated potential genetic diversity by comparing BHV-4 sequences from this study and Gen-Bank database. Within this aim, phylogenetic and recom-bination analyses have been carried out. gB and TK gene regions were focused due to a wide sequences data is available in Genbank.

Alignment results indicated that there were no significant changes between BHV-4 sequences, however, it has been observed some nucleotide substitutions that might be effective on translational level. (Figure4). Notwithstanding, these point changes in BHV-4 nucleotide level have induced a putative genotyping in phylogenetic tree in both this and previous studies<sup>4,6,10,25</sup>. Diversity and genotyping have been proportionally observed much more in TK based ML phylogenetic tree (Figure 3). gB has been mainly focused as recognizable region in BHV-4 lab-detection because of it is more conserved region, thus, it has less genotypes rather than TK based tree in phylogenetic assessment of this study (Figure 2). gB and TK tree had two and three major genotypes, respectively. In both phylogenetic trees, novel Turkish BHV-4 sequences of this study have localized in Genotype I, but TR/BHV-4/2018/Bozdogan2 has drawn a separated branch in this genotype. Surprisingly, diversity of nucleotide and distance rate in plot analysis between two sequences were more significant in gB based tree. Additionally, DN-599, the reference strain originated from America, was localized under Genotype I in gB phylogenetic tree, whereas, in TK tree was involved into Genotype II. However, novel Turkish BHV-4 sequences for this study have been involved into Genotype I as a sister taxon for European BHV-4 strains in both constructed trees (Figure 2;3). If this output has been combined by prior obtained results from Turkey, it might be claimed that BHV-4 strains belonging to Genotype I have predominantly circulated in Turkey.<sup>11,12,26</sup>

Conducted phylogenetic trees and occurred genotypes in this study were in accordance with proposed genotyping model from the previous prominent reports.<sup>4,6,7,10</sup> In contrast, a recent study by Arede et al.<sup>25</sup> mentioned three and two genotypes for gB and TK, respectively, in their phylogenetic study. This indicates that deep sequencing and detailed phylogenetic analyses, including different gene regions, needs to be performed for the accurate knowledge on BHV-4 genotyping and recombination analysis.

To the author's knowledge, one study which was presented in 2013 reported genotypes of BHV-4 circulating among Turkish cattle for the first time<sup>26</sup>. All molecular data from the mentioned prior report is compatible with the results of this study. Both studies have revealed that almost all Turkish BHV-4 sequences belonged to Genotype I.<sup>11-17,26</sup> Molecular data from previous studies were limited and not eligible rather than serological ones, thus, its comparison could not be comprehensively conducted in phylogenetic and recombination analyses.



## Conclusion

According to results, Turkish BHV-4 sequences were predominantly clustered in Genotype I, however, some nucleotide changes existed. Collected materials should be subjected to next-generation sequencing, through by, quite a knowledge on both nucleotide and amino acid data will provide the most accurate evaluation. BHV-4 might possess a highly importance as the potential agent for the non-defined reproductive diseases, however, its genetic structure and pathogenesis have not been already clear. This limits to develop novel strategies for struggle and prevention to BHV-4 related reproductive diseases. Therefore, knowledge of genetic structure and prevalence of BHV-4 should be consistently updated, and BHV-4 should be strictly taken into account for the diagnosis of reproductive diseases.

## Acknowledgment

The author thanks to M.Ç., regional veterinarian, for all support in collection of samples. This study does not contain any studies involving experimental animals and present any ethical concerns. It has been registered by Local Ethical Committee for Experimental Animals (no.64583101/2019/008). All client approved and signed the informed consent form that allowing to use of collected samples as materials for this study. This study is self-funded.

## Declaration on Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

## References

- 1) Chastant-Maillard S. Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transbound Emerg Dis*. 2015;62(3):245–251. doi:10.1111/tbed.12155
- 2) Bartha A, Juhasz M, Liebermann H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet Acad Sci Hung*. 1966;16(3):357–358.
- 3) Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*. 2010;143(1):52–69. doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.014
- 4) Bellino C, Iussich S, Biasato I, et al. Potential pathogenic role of bovine herpesvirus 4 in two dairy cows with dermatitis-pyrexia-hemorrhagic syndrome. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2763–7. doi:10.1128/JCM.00717-15
- 5) Egyed L. Bovine herpesvirus type 4: a special herpesvirus (review article). *Acta Vet Hung*. 2000;48(4):501-504. doi:10.1556/004.48.2000.4.13
- 6) Verna AE, Manrique JM, Perez SE, et al. Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: high genetic variability and novel phylogenetic groups. *Vet Microbiol*. 2012;160(1–2):1–8. doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.039
- 7) Gagnon CA, Traesel CK, Music N, et al. Whole genome sequencing of a canadian bovine gammaherpesvirus 4 strain and the possible link between the viral infection and respiratory and reproductive clinical manifestations in dairy cattle. *Front Vet Sci*. 2017;4:92. doi:10.3389/fvets.2017.00092
- 8) Zimmermann W, Broll H, Ehlers B, et al. Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol*. 2001;75(3):1186–94. doi:10.1128/JVI.75.3.1186-1194.2001
- 9) Rasheed MA, Ansari AR, Ihsan A, et al. Prediction of conserved sites and domains in glycoproteins B, C and D of herpes viruses. *Microb Pathog*. 2018;116:91-99.
- 10) Morán P, Pérez S, Odeón A, et al. Comparative analysis of replicative properties of phylogenetically divergent, Argentinean BoHV-4 strains in cell lines from different origins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019;63:97-103. doi:10.1016/j.cimid.2019.01.014
- 11) Bilge-Dagalp S, Demir AB, Gungor E, et al. The seroprevalence of Bovine Herpes Virus Type 4 (BHV-4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders. *Rev Med Vet (Toulouse)*. 2007;158(4):201.
- 12) Bilge-Dagalp S, Gungor E, Demir AB, et al. The investigation of the presence of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) in cows with metritis in a dairy herd. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 2010;57(2):87-91.
- 13) Gür S. Prevalence of bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus type 1 and 4 infections in repeat breeding cows in Western Turkey. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2011;48(3):228-233.
- 14) Aslan ME, Azkur AK, Gazyagci S. Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and Brucella spp. infections in cattle in Turkey. *J Vet Med Sci*. 2015;14-0657.
- 15) Kale M, Ata A, Kocamüftüoğlu M, et al. Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Acta Vet (Beograd)*. 2011;61(1):13-19.
- 16) Yavru S, Avci O, Kale M, et al. Serologic and virologic investigation of BHV-1, BVDV and BHV-4 in cattle with metritis. *Anim Vet Sci*. 2014;2(5):142-145.

- 17) Yildirim Y, Yilmaz V, Kalaycioglu AT, et al. An investigation of a possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in Kars district of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011;17:879-883.
- 18) Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581.
- 19) Wellenberg GJ, Verstraten ERAM, Belak S, et al. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Meth.* 2001;97(1-2):101-112.
- 20) Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Bio Evol.* 2018;35(6):1547-1549.
- 21) Vilcek S, Durkovic B, Kolesárová, M, et al. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res.* 2004;35(5):609-615.
- 22) Fuchs M, Hübert P, Detterer J, et al. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2498-2507.
- 23) Santos MJD, Trono K, Lager I, et al. Development of a PCR to diagnose BLV genome in Frozen semen samples. *Vet Microbiol.* 2007;119:10-18.
- 24) Martin DP, Murrell B, Golden M, et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 2015;1(1).
- 25) Areda D, Chigerwe M, Crossley B. Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: risk factors and phylogenetic analysis. *Epidemiol Infect.* 2018;146(7):904-912.
- 26) Bilge-Dağalp S, Babaoğlu AR, Doğan F, Timurkan MÖ, Oğuzoğlu TÇ, Özkul A, Alkan, F. Genomic Analysis of Bovine Herpesvirus Type 4 (BoHV-4) From Turkey. 4 th ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, Zürich, Switzerland, 2013, Poster Presentation.