



April - 2018



VAN VETERINARY JOURNAL

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

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT
Van YYU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu
Kampus / Van - Turkey
Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27
e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editors

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)
Prof. Dr. Handan MERT (Proof & Quality Editor)
Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)
Assoc. Prof. Dr. Ozgur ISLEYICI (Editor)
Assoc. Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Electronic Journal Editor)
Assist. Prof. Dr. Leyla MIS (Technical Editor)
Res. Assist. Rabia Mehtap TUNCAY (Editor)

Publication Board

Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Ali CINAR (Univ. of Ataturk)
Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)
Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)
Prof. Dr. Berrin SALMANOGLU (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Ehab Abu-Basha (Irbid, JORDAN)
Prof. Dr. Gert W NIEBAUER (Vienna, Austria)
Prof. Dr. Gursel SONMEZ (Univ. of Uludag)
Prof. Dr. Handan MERT (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif Ersoy)
Prof. Dr. Hasan Huseyin HADIMLI (Univ. of Selcuk)
Prof. Dr. James M. MAY (Nashville, TN, USA)
Prof. Dr. Kamil EKICI (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Kemal Ozdem OZTABAK (Univ. of Istanbul)
Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI (Univ. of Kirikkale)
Prof. Dr. Taylan AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Tevhide SEL (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Volkan AKYOL (Univ. of Uludag)
Prof. Dr. Tugba BINGOL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Nalan OZDAL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Hasan Huseyin ARI (Univ. of Cumhuriyet)
Assoc. Prof. Dr. Baris Atalay USLU (Univ. Of Cumhuriyet)
Assoc. Prof. Dr. Devrim S. AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Assoc. Prof. Dr. Yildiray BASBUGAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Bahattin CAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Bahat COMBA (Univ. of Hitit)
Assist. Prof. Dr. Zeynep KARAPINAR (Univ. of Balikesir)
Assist. Prof. Dr. Selim CINAROGLU (Univ. of Nigde Omer Halisdemir)
Assist. Prof. Dr. Kivanc IRAK (Univ. of Siirt)
Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

Scientific Board of This Issue

Prof. Dr. Mehmet AKAN (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif ERSOY)
Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY (Univ. of Ondokuz Mayıs)
Prof. Dr. Gürbüz AKSOY (Univ. of Harran)
Prof. Dr. Taylan AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN (Univ. of Mustafa Kemal)
Prof. Dr. Erol AYAZ (Univ. of Bolu İzzet Baysal)
Assist. Prof. Dr. Zeynep KARAPINAR BAŞARAN (Univ. of Balikesir)
Prof. Dr. Ali BİLGİLİ (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Nuriye Tuğba BİNGÖL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Assoc. Prof. Dr. Zafer CANTEKİN (Univ. of Mustafa Kemal)
Prof. Dr. Ebubekir CEYLAN (Univ. of Ankara)
Assist. Prof. Dr. Bahat COMBA (Univ. of Hitit)
Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU (Univ. of Fırat)
Prof. Dr. Ramazan DURGUT (Univ. of Mustafa Kemal)
Assoc. Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ (Univ. of Selçuk)
Prof. Dr. Abdurrahman GÜL (Univ. of Bingöl)
Assoc. Prof. Dr. Özgür İŞLEYİCİ (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. İhsan KELEŞ (Univ. of Erciyes)
Prof. Dr. Oktay KESKİN (Univ. of Harran)
Dr. Magdalena MATERNIAK (Pulawy Vet. Res. Inst.)
Prof. Dr. Nihat MERT (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Assoc. Prof. Dr. Gökhan OTO (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Nalan ÖZDAL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Yakup Can SANCAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Hasan SOLMAZ (Univ. of Adıyaman)
Prof. Dr. Nihat ŞINDAK (Univ. of Siirt)
Prof. Dr. Ufuk Tansel ŞİRELİ (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU (Univ. of Mehmet Akif Ersoy)
Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ (Univ. of Adnan Menderes)
Assoc. Prof. Dr. Sema USLU (Univ. of Cumhuriyet)
Prof. Dr. Mehmet YAMAN (Univ. of Mustafa Kemal)
Prof. Dr. Mecit YÖRÜK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Nazmi YÜKSEK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

This journal is published three times a year

All articles in this journal are available free of charge from <http://vfdergi.yyu.edu.tr>

Published by Onder Ofset, Van, Türkiye

Year
2018

Volume
29

Issue
1

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, DOAJ, Index Copernicus, TUBITAK-ULAKBIM, Türkiye Atif Dizini and Google Scholar



Localization and Histochemical Features of Conjunctiva Mast Cells In Turkey (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758)

Kenan ÇINAR Funda PEKMEZCİ Mustafa ÖZTOP

Süleyman Demirel University, Faculty of Science, Department of Biology Isparta, Turkey

Received: 12.07.2016

Accepted: 05.09.2017

SUMMARY

In this study, it was aimed to determine subtypes (connective tissue and mucosal mastocytes) and distributions of mast cells in all regions (marginal, tarsal, orbital, fornix and bulbar) of turkey (*Meleagris gallopavo*) conjunctiva by the implementation of the different fixatives. The conjunctiva tissues taken from 6 adult turkey were fixed in Carnoy, 10% formalin and Mota's lead acetate (BLA) solutions. BLA was the best among fixatives used in this study for shape and granules of mast cells. It was established that metachromatic dye-staining characteristics of mast cells was observed better with BLA and Carnoy solutions. By the 10% formalin fixative and Toluidine Blue (TB) staining, all of the mast cells stained blue but the metachromasia was very weak. As a result of Alcian Blue-Safranin O application, it was detected that the safranin (+) and the mixed Alcian Blue-Safranin O (+) mast cells were very rare. In the same combined staining, it was also determined that the number of Alcian Blue (+) mast cells was excessive, so a large number of mast cells was property of mucosal mast cell in the conjunctival regions. Only Safranin positive mast cell was not found in the Carnoy and 10% formalin fixatives. As a result of statistical evaluation of data with the TB and Thionin staining methods applied to determine the general distributions of mast cells, it was detected that the palpebral conjunctiva was the region with the highest number of mast cell, and fornix and bulbar conjunctiva followed by it, respectively. Mast cells gave weak yellow-green fluorescence through the Berberine sulfate application. There was no difference among the regions. In conclusion, it was determined that turkey conjunctival mast cells showed heterogeneous differences according to the staining properties.

Key Words: Turkey, Eye, Conjunctiva, Mast Cells, Histochemistry, *Meleagris gallopavo*

ÖZET

Hindi (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758) Konjunktiva Mast Hücrelerinin Lokalizasyonları ve Histokimyasal Özellikleri

Bu çalışmada hindi (*Meleagris gallopavo*) konjunktivasının tüm bölgelerinde (marginal, tarsal, orbital, forniks ve bulbar) bulunan mast hücrelerinin farklı fiksatiflerin uygulanması ile alt tiplerinin (bağ dokusu ve mukozal mastositler) ve bölgesel dağılımlarının belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 6 adet erişkin hindiden temin edilen konjunktiva dokuları Carnoy, %10 formalin, Mota'nın kurşun asetat (BLA) fiksatiflerinde ayrı ayrı fikse edildi. Mast hücrelerinin şeklini ve granüllerini en iyi tespit eden fiksatifin BLA olduğu belirlendi. BLA ve Carnoy solüsyonlarında mast hücrelerinin metakromazi özelliklerinin daha iyi gözlemlendiği tespit edildi. %10 formaldehit tespit solüsyonunda Toluidine Blue (TB) boyamasında mast hücrelerinin tamamının mavi renkte boyandığı ancak metakromazi özelliğinin çok zayıf olduğu saptandı. Alcian Blue-Safranin O uygulaması sonucunda safranin (+) ve karışım halinde Alcian Blue-Safranin O (+) mast hücrelerinin çok nadir olduğu tespit edildi. Konjunktiva bölgelerinde bu kombine boyama sonucunda Alcian Blue (+) mast hücre sayısının fazla olduğu yani mast hücrelerinin büyük bir kısmının mukozal mast hücresi karakterinde olduğu belirlendi. Carnoy ve %10'luk formalin fiksatiflerinde tek başına safranin pozitif mast hücresine rastlanmadı. Mast hücrelerinin genel dağılımlarının belirlenmesi amacıyla uygulanan TB ve Thionin boyama sonucunda mast hücre sayısının en fazla olduğu bölgenin palpebral konjunktiva olduğu bunu sırasıyla forniks ve bulbar konjunktivanın izlediği belirlendi. Berberin sülfat uygulaması ile mast hücrelerinde zayıf sarı-yeşil floresan oluştuğu tespit edildi. Bölgeler arasında bir farka rastlanmadı. Sonuç olarak hindi mast hücrelerinin bölgesel dağılımları açısından farklılık gösterdikleri ve boyanma özelliklerine göre ise heterojen karaktere sahip oldukları belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hindi, Göz, Konjunktiva, Mast Hücreleri, Histokimya, *Meleagris gallopavo*

GİRİŞ

Gözün biyolojik zırhı olarak kabul edebilecek bir yapı olan konjunktiva, gözün korneaya kadar olan bölümünü ve göz kapaklarının iç yüzeyini kaplayan ince, saydam bir zarıdır. Bu kaygan özel zar; gözün hareketi esnasında gözkapaklarının göz küresine zarar vermemesini, gözün iç kısmının dış ortamdaki ayrılmasını ve izole olmasını sağlar. Aynı zamanda fiziksel bariyer görevi yaparak tozların, yabancı cisimlerin, mikroorganizmaların göz küresinin arka kısımlarına ulaşarak yangı oluşturmasını engeller (Akgöz 2006).

Oküler yüzey kornea, konjunktiva ve limbustan (bulbar konjunktiva) oluşmaktadır. Bu bölge sıklıkla iltihabi, gerekse immunolojik olaylar açısından aktif bir özellik taşımaktadır. Kornea ve konjunktiva gibi iki farklı dokunun komşuluk gösterdiği oküler yüzey polenler, toz, böcek partikülleri, hayvan tüyleri ve diğer proteinler olmak üzere çok sayıda alerjenle karşı karşıya kalır. Bu nedenle, antijen sunumu ve sistemik immün yanıtı bakımından oküler yüzey potansiyel bir alandır (Pehlivan 2005; İrkeç ve Bozkurt 2008).

Konjunktiva, sadece bütün ekzojen iritanlara ve enfeksiyonlara açık olması ve bu nedenle de alerjik reaksiyonlara eğilimi bulunmasıyla değil, sıklıkla endojen hastalıklara ve metabolik bozukluklara katılması bakımından da hastalıkların sıklıkla yerleştiği bir dokudur. Konjunktiva kesesi pratikte hiçbir zaman mikroorganizmalardan arı değildir, ancak açık olması, gözyaşının buharlaşması ve orta derecedeki kan akımı nedeniyle nispeten düşük olan ısıya bağlı olarak bakteriler kolayca yayılmamaktadır (Özçetin 1989).

Konjunktival mast hücreleri, konjunktivadaki alerjik inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynar ve aktif hastalık boyunca salınan IL- 4 ve multifonksiyonel sitokinleri büyük oranda depolayabilir. Oküler yüzeyde mast hücre sayısı alerjik konjunktivitisin bütün formlarında artar (Morgan ve ark. 1991; Leonardi 2002; Yao ve ark. 2003).

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada SDÜ Ziraat Fakültesi Çiftçi Eğitim Tarımsal Uygulama Merkezi tavuk kümesinden temin edilen 6 adet hindi (*Meleagris gallopavo*, L., 1758) araştırma materyali olarak kullanıldı (Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 29.08.2012 tarih ve 06 sayılı kararı ile Etik Kurul onayı alınmıştır: B.30.2.SDÜ.0.05.06.00- 213). Dekapitasyon yöntemiyle ötenazi uygulanan hindilerin alt ve üst göz kapaklarına ait konjunktivalardan alınan örnekler materyal olarak kullanıldı. Alınan doku örnekleri Carnoy (60 ml absolut etanol, 30 ml kloroform, 10 ml glasiyal asetik asit) solüsyonunda (Bancroft ve ark. 1996) +4°C'de 30 dakika ve takiben oda ısısında 2 saat, %10'luk formalin (10 ml formaldehit, 90 ml distile su) (Bancroft ve ark. 1996) solüsyonunda, 24 saat ve Mota'nın bazik kurşun asetat (BLA - 1 g basic lead asetat, 50 ml etanol, 50 ml distile su, 0.5 ml glasiyal asetik asit) (Strobel ve ark. 1981) solüsyonunda 24 saat süre tespit edildi. Örnekler BLA ve %10'luk formalin solüsyonu için 1 gece akarsuda yıkandıktan sonra doku takibi aşamalarından geçirilerek (yükselen derecedeki alkoller (%70, %80, %96, %100) ve ksiloller) parafinde bloklandı. Bloklardan 5-6 mikrometre kalınlığında alınan kesitlere aşağıdaki boyama yöntemleri uygulandı:

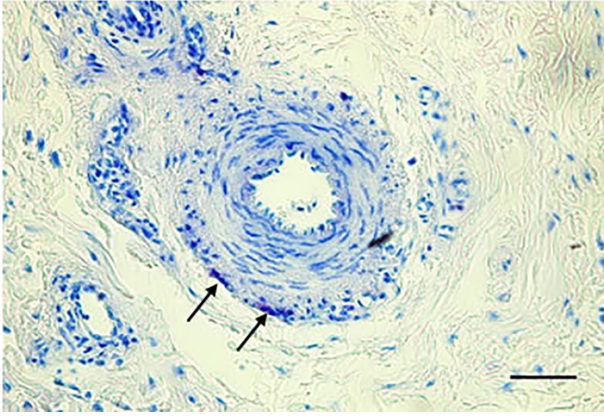
1. Mast hücrelerinin dokudaki dağılımını ve tespit solüsyonuna duyarlılığını belirlemek için kısa süreli Toluidin Blue (TB) (Wolman 1971)
2. Mast hücrelerinin mukoza ve bağ dokusu mast hücresi alt tipini belirlemek için Alcian Blue / Safranin O kombine boyaması (AB/SO)(Csaba 1969)
3. Mast hücrelerinin genel dağılımlarının belirlenmesi için Thionin boyama yöntemi (Cook 1961)
4. Mast hücrelerinin heparin içeriğini floresans bir boya aracılığıyla göstermek amacıyla Berberin Sülfat (BS) boyama yöntemi (Harem ve ark. 2011).
5. Mast hücrelerinin proteoglikan içeriğini belirlemek amacıyla Kritik Elektrolit Konsantrasyonu (CEC) boyama yöntemi (Noviana ve ark. 2001)

Mast hücrelerinin bölgesel dağılımları belirlenerek her bölge için 10'ar preparatta sayım yapıldıktan sonra bölgeler arası yoğunluklarının karşılaştırılması SPSS-17 programında yapıldı. Örneklerin değerlendirilmesinde ise "One Way Anova" testi kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek gerekli bölgelerden fotoğraf çekimi yapıldı.

BULGULAR

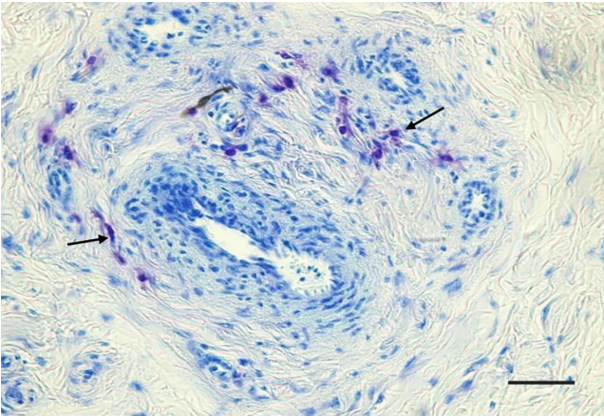
Tespit solüsyonlarına göre mast hücrelerinin heterojenite gösterdiği ve Carnoy ve Mota kurşun asetat (BLA) tespit solüsyonlarının, %10'luk formaline göre daha uygun oldukları tespit edildi. Motanın kurşun asetat (BLA) tespit solüsyonun mast hücrelerinin şeklini ve granüllerini en iyi belirleyen fiksatif olduğu belirlendi. Carnoy fiksatifinin ise mast hücrelerinin sayısal dağılımlarının ortaya konmasında daha iyi sonuç verdiği saptandı. Mast hücrelerinin şekillerinin daha çok yuvarlak ve fusiform olduğu saptandı. Fusiform şekilli mast hücrelerinin marginal ve tarsal konjunktivada daha yoğun bulunduğu tespit edildi. Mast hücrelerinin dokudaki dağılımını ve tespit solüsyonuna duyarlılığını belirlemek için kısa süreli süreli Toluidin Blue uygulaması sonucunda %10'luk formalin solüsyonunda tespit edilmiş dokularda orbital konjunktivanın stromasında çoğunlukla kan damarı çevresinde mast hücrelerinin zayıf metakromazi gösterdiği (Şekil 1), Carnoy ve Motanın kurşun asetat (BLA) fiksatifleri ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin bu uygulama sonucu metakromatik özelliklerinin daha yoğun ve tipik olduğu (Şekil 2) belirlendi. BLA fiksatifli ile tespit edilen ve Toluidine blue uygulanan dokularda kas demetleri arasında da mast hücreleri gözlemlendi. Toluidine blue uygulaması sonucu yapılan nitel gözlem sonucunda mast hücrelerinin genel olarak kan damarları, lenf folikülleri ile kıl folikülleri çevresinde ve stromada yoğun olarak bulunduğu tespit edildi.

Mast hücrelerinin genel dağılımlarının belirlenmesi amacıyla her üç fiksatif uygulaması ve Thionin boyaması sonucunda mast hücrelerinin metakromazi gösterdiği saptandı. Bu uygulamada da Toluidine blue uygulaması elde edilen sonuçlarla benzer şekilde mast hücrelerinin kan damarları etrafında yoğun olarak bulunduğu tespit edildi.



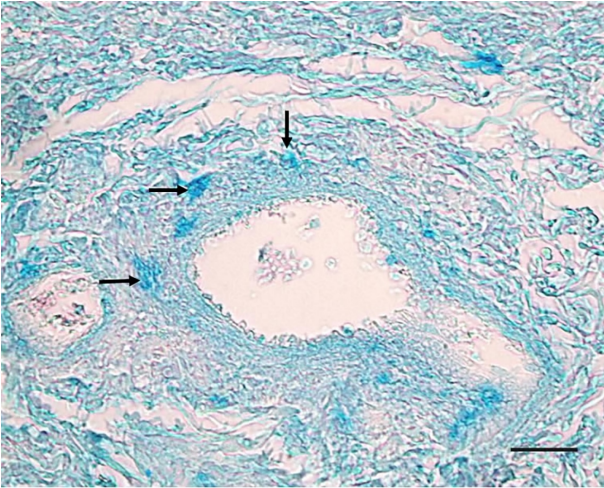
Şekil 1. Orbital konjunktiva kan damarı çevresinde mast hücreleri (oklar). Formalin uygulaması. TB. Bar: 20 µm

Figure 1. Orbital conjunctiva. The mast cells (arrows) around the blood vessel. Formalin application. TB. Bar: 20 µm



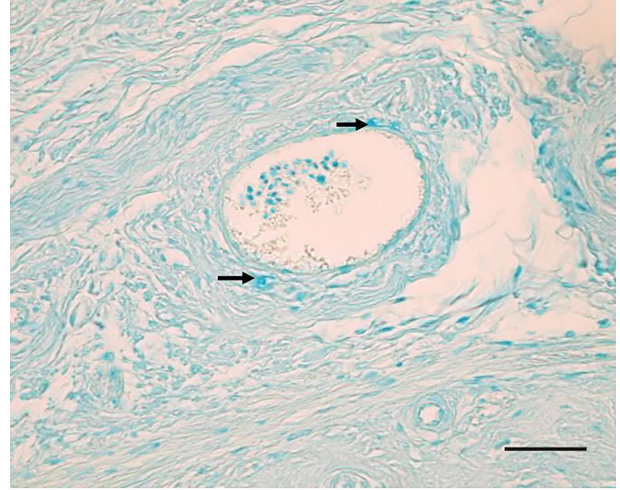
Şekil 2. Marginal konjunktiva kan damarı çevresinde mast hücreleri (oklar). Carnoy uygulaması. TB. Bar: 20 µm

Figure 2. Marginal conjunctiva. The mast cells (arrows) around the blood vessel. Carnoy application. TB. Bar: 20 µm



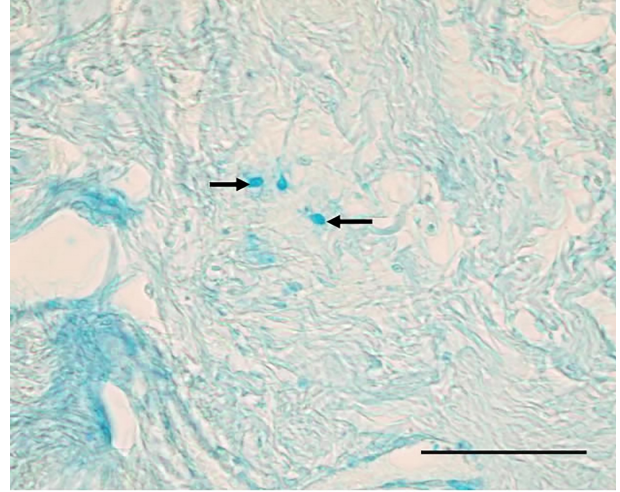
Şekil 3. Orbital konjunktivada kan damarı çevresinde Alcian Blue (+) mast hücreleri (oklar). Carnoy uygulaması. AB/SO. Bar: 20 µm

Figure 3. Orbital conjunctiva. The Alcian Blue (+) mast cells (arrows) around the blood vessel. Carnoy application. AB/SO. Bar: 20 µm



Şekil 4.Tarsal konjunktiva. Kan damarı etrafında 0.2-0.3 M CEC (+) mast hücreleri. (oklar) Formalin uygulaması. Bar: 25 µm.

Figure 4. Tarsal conjunctiva. The 0.2-0.3M CEC (+) mast cells (arrows) around the blood vessel. Formalin application. Bar: 20 µm



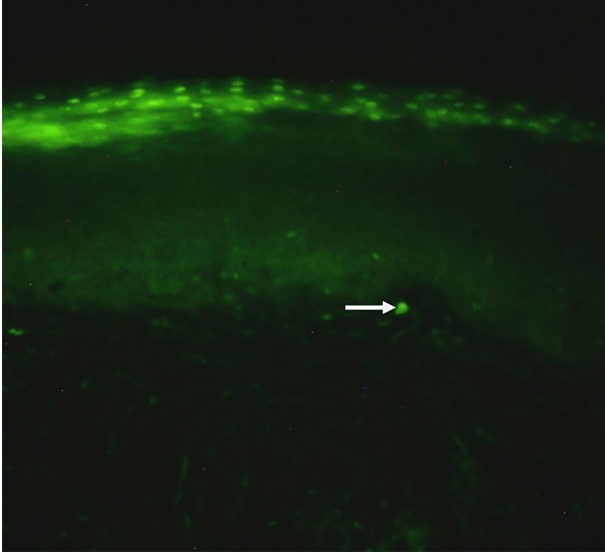
Şekil 5. Orbital konjunktiva. 0.7-0.8 M CEC (+) mast hücreleri. (oklar) BLA uygulaması. Bar: 25 µm.

Figure 5. Orbital conjunctiva. The 0.7- 0.8 M CEC (+) mast cells (arrows). BLA application. Bar: 20 µm

Mast hücrelerinde bulunan heparinin görüntülenmesi amacıyla uygulanan berberin sülfat boyama metodu sonucu konjunktivanın tüm bölgelerinde bulunan mast hücreleri zayıf yeşil floresan ışığa gösterdi (Şekil 6). Konjunktivanın bölgeleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Formalin fiksatif ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin daha belirgin sarı-yeşil floresan verdiği saptandı (Şekil 7).

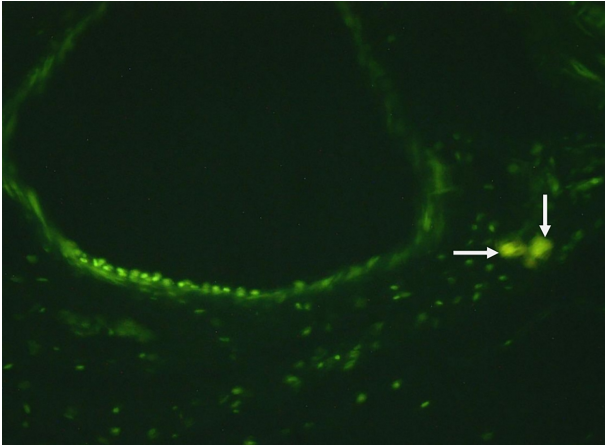
Mast hücrelerinin mukoza ve bağ dokusu mast hücresi alt tipini belirlemek için uygulanan Alcian Blue/Safranin O kombine boyaması sonucunda Alcian blue (+), Safranin (+) ve Alcian Blue-Safranin O (+) olmak üzere üç tip mast hücresi tespit edildi. Uygulanan bütün fiksatiflerde mast hücrelerinin büyük bir çoğunluğunun Alcian blue (+) olduğu saptandı (Şekil 3). Tek başına Safranin (+) ile Alcian Blue-Safranin O (+) olan mast hücrelerine ise çok nadir rastlandı. Sadece BLA fiksatif uygulanan dokularda az sayıda safranin (+) mast hücresi görülmesine karşın, Carnoy ve %10'luk formalin fiksatif uygulanan dokularda tek başına Safranin (+) mast hücresine rastlanmadı. Alcian

Blue pozitif (+) mast hücrelerinin daha çok kapillar damarlar etrafında yerleştikleri belirlendi.



Şekil 6. Marginal konjunktiva. Lamina propriyada mast hücreleri. (ok) Floresans boyaması ve Carnoy uygulaması. BS. X1000

Figure 6. Marjinal conjunctiva. The mast cell (arrow) in lamina propria. Fluorescence staining and carnoy application BS. X 1000



Şekil 7. Orbital konjunktiva. Kıl folikülü çevresinde mast hücreleri. (oklar) Floresans boyaması ve Formalin uygulaması. BS. X1000.

Figure 7. Orbital conjunctiva. The mast cells (arrows) around the hair follicle. Fluorescence staining and Formalin application. BS. X 1000

TARTIŞMA ve SONUÇ

Akgöz, (2006) köpek konjunktivasında Carnoy fiksasyonunu takiben kısa süreli Toluidine blue uygulamasında mast hücrelerinin metakromazi gösterdiğini ancak formalin fiksatifinde bu özelliği gösteremediğini belirtmiştir. Bu çalışmada formalin fiksatif uygulaması sonucunda mast hücrelerinin metakromazi özelliği göstermediği ancak Carnoy ve BLA fiksatiflerinin uygulamasında bu özelliğin görüldüğü tespit edildi. Yine aynı araştırmacının (Akgöz 2006) bulgularıyla benzer biçimde bu çalışmada da marginal konjunktivada mast hücrelerinin genelini yassı ve oval görünümde olduğu, forniks konjunktivaya doğru ise mast hücrelerinin şeklinin yuvarlak yapıları oldukları gözlemlendi. Rat

(McMenamin ve ark. 1996) ve köpek (Akgöz 2006) konjunktivasına Toluidine blue uygulaması sonucunda mast hücrelerinin en fazla palpebral konjunktiva olduğu bunu takiben limbusta, seyrek olarak da konjunktivanın geri kalan parçasında yerleştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde mast hücre sayısının en fazla olduğu bölgenin palpebral konjunktiva içerisindeki marginal konjunktiva olduğu bunu forniks ve bulbar konjunktivanın takip ettiği saptandı.

Rat (Becker ve ark. 1985), kedi (Noviana ve ark. 2001 b), köpek (Kube ve ark. 1998) ve tavuğun (Wang 1991) çeşitli dokularındaki mast hücrelerinin alcian blue pozitif, safranin pozitif ve alcian blue safranin pozitif olmak üzere üç tip granül içerdiği ve bu nedenle heterojeniteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da aynı bulgu elde edildi. Yine benzer bir bulgu olarak köpek (Akgöz 2006), hindi (Uslu ve Yörük 2008) ve koyun (Chen ve ark. 1993)'da da farklı dokularda safranin pozitif mast hücre sayısının Alcian blue pozitif boyanan mast hücrelerine kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Akgöz, (2006) köpek konjunktivasında bu çalışmadaki sonuçlarla benzer şekilde tüm sülfatlı proteoglikanları belirlemek amacıyla 0.2/0.3 M'lık CEC, heparini belirlemek amacıyla 0.7/0.8 M'lık CEC uygulamıştır. Ayrıca her iki boyamanın formalinden etkilendiği carnoy fiksatifinin proteoglikan içeriğini koruduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada fiksatifler arasında böyle bir farklılığa rastlanmadı. Tavuk ile bildircin (Karaca ve Yörük 2004) ve tavşan (Erpek ve Otlu 1995) mast hücre heterojenitesi üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan fiksatifler (formalin, izotonik formol asetik asit (IFAA) ve Carnoy) içerisinde Carnoy'un mast hücrelerinin metakromatik özelliklerinin belirlenmesi ve sayısal dağılımlarının ortaya konmasında daha iyi sonuç verdiğini belirtilmiştir. Bu çalışmada da aynı bulgular elde edildi. Rat (Becker ve ark. 1985), kedi (Noviana ve ark. 2001 b), köpek (Kube ve ark. 1998) ve tavuğun (Wang 1991) çeşitli dokularındaki mast hücrelerinin alcian blue pozitif, safranin pozitif ve alcian blue safranin pozitif olmak üzere üç tip granül içerdiği ve bu nedenle heterojeniteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da aynı bulgu elde edildi. Yine benzer bir bulgu olarak köpek (Akgöz 2006), hindi (Uslu ve Yörük 2008) ve koyun (Chen ve ark. 1993)'da da farklı dokularda safranin pozitif mast hücre sayısının Alcian blue pozitif boyanan mast hücrelerine kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Uslu ve Yörük, (2013) yerli ördek ve kazın alt solunum yolları ve akciğerlerinde bulunan mast hücrelerinin heterojenitesi üzerine yaptıkları çalışmalarında Carnoy, izotonik formaldehit asetik asit (IFAA) ve Mota'nın bazik kurşun asetat (BLA) fiksatiflerini karşılaştırmışlar ve mast hücrelerinin sayısal verileri için en uygun tespitin IFAA olduğu, granül yapısını belirlemek için ise en uygun tespitin BLA solüsyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada mast hücrelerinin sayısal tespiti için en uygun fiksatifin Carnoy bunu takiben BLA olduğu belirlendi. Araştırmacıların (Uslu ve Yörük 2013) bulgularıyla uyumlu şekilde mast hücrelerinin granülleri için en uygun fiksatifin BLA olduğu saptandı. Demirbağ ve ark. 2012 ise rat ince bağırsağındaki mast hücre granüllerinin tespiti Carnoy fiksatifinin uygun olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise Carnoy'un konjunktiva mast hücreleri için uygun bir fiksatif olduğu tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen bulgulara paralel olarak Akgöz (2006) köpek konjunktivasında 0.2/0.3M ve 0.7/0.8M'lık CEC uygulamasında tüm mast hücrelerinin mavi boyadığı 0.7/0.8 M'lık CEC uygulamasında ise heparan sülfat içeren mast hücrelerin boyandığını belirtmişler.

Tavuk ile bıldırcın (Kurtde de ve Yörük 1995) ve köpek (Eren 2000; Aştı ve ark. 2005) derisinde mast hücrelerinin bu çalışmada da benzer şekilde kan damarları ve kıl folikülleri çevresinde olduğu gibi lenf folikülleri etrafında da yerleşim gösterdikleri tespit edildi.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 3307-YL1-12 No'lu bu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akgöz D (2006).** Köpeklerin konjunktivasında bulunan mast hücrelerinin histokimyasal, enzim histokimyasal ve immunohistokimyasal özellikleri. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Ens*, Yüksek lisans tezi. 68s. Kayseri.
- Aştı RN, Kurtde de A, Kurtde de N, Ergün E, Güzel M (2005).** Mast cells in the dog skin: distribution, density, heterogeneity and influence of fixation techniques. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 7-12.
- Bancroft JD, Steven A, Turner DR (2013).** Theory and Practice of Histological Techniques. *Churchill Livingstone*, 7th ed. New York.
- Chen Z, Irani AA, Bradford TR, Craig SS, Newlands G, Miller H, Huff T, Simmons H, Schwartz LB (1993).** Localization of rat tryptase to a subset of the connective tissue type of mast cell. *J Histochem Cytochem*, 41(7), 961-969.
- Cook HC (1961).** A modified thionin technique for mast cells in tissue sections. *J Med Lab Technol*, 18, 188-189.
- Csaba G (1969).** Mechanism of the formation of mast-cell granules. II. Cell-free model. *Acta Biol Acad Sci Hung*, 20(2), 205-210.
- Demirbağ E, Çınar K, Kutlar MH, Eroğlu G, Sarı SM (2012).** Ratların (*Rattus rattus*) ince bağırsaklarında mast hücre dağılımı ve heterojenitesi. *SDÜ Fen Derg*, 7(2), 92-99.
- Eren Ü (2000).** Köpek derisinde mast hücreleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47, 167-175.
- Erpek S, Otlı A (1995).** Tavşan ağız mukozasında mast hücrelerinin dağılımı. *Turgut Özal Tıp Merk Derg*, 2 (3), 258-267.
- Harem MK, Liman N, Alan E (2011).** Distribution, density and histochemical profiles of the lung mast cells during the post-hatching period of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Res Vet Sci*, 90, 1-8.
- İrkeç M, Bozkurt B (2008).** Konjunktiva İmmunolojisi. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol*, 1 (3), 66-71.
- Karaca T, Yörük M (2004).** A morphological and histometrical study on distribution and heterogeneity of mast cells of chicken's and quail's digestive tract. *Van Vet J*, 15(1-2), 115-121.
- Kube P, Audige L, Künther K, Welle M (1998).** Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochem Cell Biol*, 110(2), 129-135.
- Kurtde de N, Yörük M (1995).** Tavuk ve bıldırcın derisinde mast hücrelerinin morfolojik ve histometrik incelenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42, 77-83.
- Leonardi A (2002).** The central role of conjunctival mast cells in the pathogenesis of ocular allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2, 325-331.
- McMenamin PG, Morrison SM, McMenamin C (1996).** Immunomorphologic studies of mast cell heterogeneity, location and distribution in the rat conjunctiva. *J Allergy Clin Immunol*, 97 (6), 1375-86.
- Morgan SJ, Williams JH, Walls AF, Church MK, Holgate ST, McGill JJ (1991).** Mast cell numbers and staining characteristics in the normal and allergic human conjunctiva. *J Allergy Clin Immunol*, 87 (1), 111-6.
- Nichols BA (1996).** Conjunctiva. *Microsc Res Tech*, 33, 296-319.
- Noviana D, Mamba K, Makimura S, Horii Y (2001a).** Distribution histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs. *J Mol Histol*, 35(2), 123-132.
- Noviana D, Kono F, Nagakui Y, Shimizu H, Mamba K, Makimura S, Horii Y (2001b).** Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochem J*, 33 (11-12), 597-603.
- Özçetin H (Ed) (1989).** Parson's Göz Hastalıkları. Atlas Tıp Kitapçılık Yayınları, 436s, Ankara.
- Pehlivan KD (2005).** Bimatoprost, travoprost, lavanoprost'un gözyaşı işlevi ve göz yüzeyi üzerine etkilerinin karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1.Göz Kliniği Uzmanlık Tezi. 40 s. İstanbul.
- Strobel S, Miller H, Ferguson A (1981).** Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol*, 34(8), 851-858.
- Uslu S, Yörük M (2008).** Hindilerde sindirim sisteminde mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerine morfolojik ve histometrik araştırmalar. *Van Vet J*, 19(2), 47-51.
- Uslu S, Yörük M (2013).** Yerli Ördek (*Anas platyrhynchos*) ve Kazın (*Anser anser*) alt solunum yolları ve akciğerlerinde bulunan mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerine morfolojik ve histometrik araştırmalar. *Kafkas Üni Vet Fak Derg*, 19(3), 475-482.
- Wang T (1991).** Mast cells in the chick digestive tract. II. Fixation, distribution, histochemistry and ultrastructure. *Tokai J Exp Clin Med*, 16(1), 27-32.
- Wolman M (1970)** On the use of the polarised light in pathology. *Pathol Annu*, 5, 381-416.
- Yao L, Baltatzis S, Zafirakis P, Charalampos LR, Voudouri A, Markomichelakis N, Zhao T, Foster CS (2003).** Human mast cell subtypes in conjunctiva of patients with atopic keratoconjunctivitis, ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson Syndrome. *Ocul Immunol Inflamm*, 11(3), 211-222.





The Investigation of Bioequivalence of Some Enrofloxacin Formulations Following Parenteral Administration in Calves

Gül Banu ÇİÇEK BİDECI¹ Sezai KAYA²

¹ District Directorate of Food, Agriculture & Animal Husbandry, Devrekani, Kastamonu, Turkey

² Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology & Toxicology, Ankara, Turkey

Received: 06.04.2017

Accepted: 29.09.2017

SUMMARY

In this study, the bioequivalence of two enrofloxacin preparations were investigated. Ten unmedicated female calves (Jersey strain, 46-50 day-old) were included. The calves were divided into two groups including five calves each. Reference drug and test drug were administered intramuscularly at a dose of 2.5 mg per kg to group 1 and group 2, respectively. Blood samples were taken before (0.0 min) and after the drug administration at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 and 36th hours. Before the plasma drug concentration measurements, enrofloxacin study standards and the new standards that were obtained after adding initial standards to drug-free plasma were applied to high-performance fluid chromatography (HPFC). Standard curves were drawn, and the recovery value was calculated. The sensitivity of the extraction method was detected 0.05 µg/ml. The mean recovery value of extraction procedure was about 75-96 percent. The average retention time for enrofloxacin was obtained at 6.61-6.6th. Plasma enrofloxacin concentrations were measured by HPFC following acetonitrile extraction process. The plasma concentration-time curve for each animal showed that enrofloxacin followed the two-compartment open model. It was seen that the area under the curve and t_{max} value (µT/ µR=120) of the test drug were acceptable (80-125%). However, C_{max} value was not in the acceptable range (0.80-1.25). Test Drug was determined to be used instead of the reference drug.

Key Words: Bioequivalence, Calf, Enrofloxacin, Pharmacokinetic, HPFC

ÖZET

Parenteral Kullanılan Bazı Enrofloksasin Müstahzarlarının Buzağılarda Biyoşdeğerliğinin Araştırılması

Bu çalışmada, buzağılarda parenteral olarak kullanılan iki farklı enrofloksasin müstahzarının biyoşdeğerliği incelendi. Çalışmada ilaç uygulanmamış, Jersey ırkı 46-50 günlük 10 dişi buzağı kullanıldı. Hayvanlar her birinde 5 hayvan bulunan iki gruba ayrıldı. Grup 1'e Referans ilaç, Test ilaç Grup 2'ye 2.5 mg/kg c.a dozunda, kas içi uygulandı. Hayvanlardan uygulama öncesi (0.0 dk) ilaç uygulamalarını takiben 0.25 saatten başlamak üzere 0.5., 1., 2., 4., 8., 12., 18., 24. ve 36. Saatlerde kan alındı. Plazma ilaç yoğunluğu ölçülmesinden önce; enrofloksasin çalışma standartları ve bu standartların ilaç içermeyen plazmalara katılarak elde edilen standartlar yüksek basınçlı sıvı kromatografisine (YBSK) uygulandı. Uygulamalar sonrası standart eğriler çizildi ve geriye kazanç hesaplandı. Yöntemin duyarlılığı 0.05 µg/ml olarak tespit edildi. Geriye kazanç %75-96 olarak bulundu. Enrofloksasinin 6.61-6.66 dakikalarda pik verdiği belirlendi. Plazmada enrofloksasin yoğunluğunun ölçülmesi için; plazmaların asetonitril ile özütleme işlemi yapıldı ve YBSK'ya uygulandı. Her hayvan için çizilen plazma yoğunluğu-zaman eğrisinden ilacın vücutta 2- bölmeli dışarı açık modele göre dağıldığı anlaşıldı. Test ilacın (plazma ilaç yoğunluk-zaman eğrisi altındaki kalan alan) EAA ve t_{max} (plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi) değerinin (µT/ µR=120) kabul edilebilir sınır içerisinde olduğu (%80-125) ancak Test ilacın Ydoruğu (plazma doruk ilaç yoğunluğu) değerinin kabul edilebilir sınırlara (0.80-1.25) uymadığı görüldü. Sonuç olarak Test ilacın Referans ilaç yerine kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyoşdeğerlik, Buzağı, Enrofloksasin, Farmakokinetik, YBSK

INTRODUCTION

Bioequivalence is the property of two pharmaceutically equivalent products (test and reference) that possess similar bioavailability and produce the same effect at the site of physiological activity (Kaya 2000; Kayaalp 2008; Traş and Yazar 2002). For

bioequivalence, the area under the curve (AUC) and maximum serum concentration (C_{max}) data for the bioavailability of two drugs must be at the 90% confidence interval and between 80-125% (Hantash et al. 2008). Bioequivalence tests play a major role in the evaluation of drug formulations with similar plasma drug concentration-time curve and the same pharmacological and clinical

effects (Toutain and Koritz 1997). It is a requirement that documents relating to bioavailability and pharmacodynamics studies should be included for the registration of drugs. Exploring the bioequivalence of the reference drug (drug produced by the pioneer company) and the generic drug (drug produced by any company after the reference drug was produced) is the most important factor in proving that the generic drug may be used instead of the reference drug as an equivalent drug (Öner 2003). The interchangeable usage, as well as the quality, efficacy, and safety of the drugs, are important in the licensing, in the freedom of the health professionals and also for the cost of the treatment.

Enrofloxacin is a bactericidal antimicrobial drug in the fluoroquinolone group, developed for use only in the veterinary field (Cabanes et al. 1992; Davidson et al. 1986; Kaya 2000). The spectrum of the effect of enrofloxacin is broad. It is effective against gram negative and Gram positive bacteria, Mycoplasma, Rickettsia, Ehrlichia and Chlamydia (Elmas et al. 2001; Elmas et al. 2000). Enrofloxacin is used in all pets, especially in the ruminant and poultry. In calves, enrofloxacin finds utilization in the respiratory system infections, septicemia caused by colibacillosis and in cases of intestinal inflammation by oral and parenteral ways (Bauditz 1987; Davidson et al. 1986; Kaartinen et al. 1997).

In this study, we aimed to investigate the bioequivalence of 2 formulations containing enrofloxacin in calves.

MATERIALS and METHODS

Chemicals, Drugs, and Solutions

The chemicals, drugs, and solutions that were used in the study are as follows

- Acetonitrile (ACN): Gradient Grade for Liquid Chromatograph, Merck 100030
- Triethylamine (C₂H₅)₃N: Sigma T-0886
- Methanol: Gradient Grade for Liquid Chromatograph, Merck 100067
- Deionised water
- Enrofloxacin: effectiveness, 100.3%; production date: 01.01.2009, Expiry date: 01.01.2011; Serial Number: 176293; Lot 010001160374; Batch KP047PZ. Provided by Bayer Turk; Reference drug: 50 mg/ml injectable enrofloxacin, 20 ml per vial
- Test Drug: 100 mg/ml injectable enrofloxacin, 20 ml per vial

The reference and test drugs were provided directly by producing company. The production and expiry date of the drugs and serial numbers were noted. The amount of active ingredients of the drugs were established. These values were measured as 53.5 µg/ml for the reference drug and 95.6 µg/ml for the test drug. The amounts of active ingredient per volume were determined as normal.

Standards

Standard Solution: For enrofloxacin stock standard (1mg/ml) preparations, 10mg enrofloxacin was weighed and dissolved in 10ml methanol.

Enrofloxacin study standard 1 (0.1mg/ml): 100µl of 1mg/ml enrofloxacin stock standard was taken and prepared by filling to 1ml with methanol. 0.25 and 0.5µg/ml dilutions were prepared from this study standard solution.

Enrofloxacin study standard 2 (0.01mg/ml): 100µl of enrofloxacin study standard 1 was taken; filled to 1ml with

methanol. 1, 2.5 and 5µg/ml dilutions were prepared from this study standard solution.

Trial Animals and Their Care-Feeding

The study was conducted with ten female calves of Jersey race and 46-50 days old (mean 40-45 kg) at Karaköy Agricultural Enterprise. The animals were taken to a separate environment 15 days in advance, and medication administration was restrained. Throughout the trial, the animals were fed with unmedicated feed. Calf growing feed, water, and hay were given freely as feed. They continued to be fed by 3 liters of milk twice a day. The study was reviewed by Ankara University Animal Trials Local Ethics Committee and approved with decision number 2007-7-17 and file number 2007-56.

Grouping of the Animals, Adminstrating the Drugs, Collecting Blood Samples and Drug Analysis in Plasma

The animals were weighed one day before the drug administration for accurate dosage purposes. The animals were divided into two groups (Group 1 and Group 2) each consisting of 5 animals. Group 1 was assigned to the reference drug group, and Group 2 was assigned to the test drug group. In both groups, the drugs were administered intramuscularly (m. semitendinosus, m. semimembranosus). The dose for all administrations was determined as 2.5mg/kg. 8-10 ml blood was collected from the animals through *V. jugularis* in vacuumed heparinized tubes before the administration (0.0 min.), and starting at 0.25th hour following the drug administration at 0.5th, 1st, 2nd, 4th, 8th, 12th, 18th, 24th and 36th hours. Plasmas were stored at -20°C until the drug analyses. The analyses were performed within two months. Sixty minutes after collecting the blood samples, the plasma was separated through centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes. The extraction and sample measurement in enrofloxacin analyses in the plasma was conducted by Düzen Laboratories Group using HPFC. In the extraction and measurement of enrofloxacin from the plasma, the method used by Anadon et al. (1995) was taken as a basis. According to this, 200µL plasma was taken into Eppendorf tubes. 300µL acetonitrile was added. The tubes were capped and gently vortexed (2 min.). Then, they were centrifuged at 2500 rpm for 10 min. The acetonitrile part at the top was taken into vials with an insulin injector. 300µL deionized water was added and gently vortexed (0.5 min.). The vials were submitted to HPFC. The automated sampler was set to 280nm wavelength and to use 20µL from this extract. It was submitted to the device for 12 min. The flow rate of the mobile phase was set at 1ml/min and the column temperature as 30 °C. Before the extraction, the retention time, recovery and sensitivity limit were calculated. The standard curves were drawn according to the results obtained. For these studies, enrofloxacin study standard solutions 1 (0.1mg/ml) and 2 (0.01mg/ml) were prepared with methanol. From these standard study solutions, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 µg/ml dilutions of enrofloxacin were prepared with methanol and plasma.

HPFC parameters and instrument properties are as follows:

- High-Pressure Liquid Chromatograph (HPFC): Agilent Technologies, Model 1100 series, California) and attachments
- Detector: VWD, G1314A, Serial JP24020987
- Column heater: COLCOM, G1316A, Serial DE32133649
- Autosampler: ALS, G1329A, DE23910894
- Column: Nucleosil 100 - 5 C18 150, 4,6 µm Serial No: E 10021556, Macherey-Nagel

- Wavelength: 280 nm
- Mobile Phase Flow Rate: 1 ml/min
- Column Temperature: 30 °C
- Mobile Phase: 850ml deionized water + 150ml Acetonitrile + 5ml triethylamine (pH was set as 2.5 with orthophosphoric acid).

Pharmacokinetic Calculations and Statistical Calculations

The area under the plasma drug concentration-time curve (AUC), the time for plasma drug concentration to reach the peak value (T_{max}) and plasma peak drug concentration (C_{max}) were calculated. The other pharmacokinetic calculations using the T_{max} and C_{max} plasma drug concentration curve were made with Pharmacokinetic Calculation (PKCALC) program which is based on the equation reported by Shumaker (1986) and Wagner (1979). For the statistical calculations, the "SPSS 11.0 for Windows" statistics package program was used. Data were presented as an arithmetic mean ± standard deviation or the pharmacokinetic data, One-Way Analysis of Variance (ANOVA) was used, and the differences between the groups were evaluated through Duncan test.

RESULTS

The standards prepared using the enrofloxacin active ingredient were injected to HPFC and the retention time was determined as 6.61-6.66 min. (Figure 1) The peak areas obtained were recorded. The extraction was performed by adding these standards to unmedicated plasma, and they were placed in the autosampler. The autosampler used 20 µl of that solution. The standard curve was drawn using the peak areas obtained from the standards, and the equation of the resulting curve was calculated (Figure 2). By using these curves, the recovery value was found as 75-96%. The peak areas obtained from the plasmas were inserted into the equation, and the enrofloxacin in the plasmas was determined.

As a result of the trials conducted with enrofloxacin study standards, it was understood that 0.05 µg/ml enrofloxacin might be measured with the method. The active ingredient amounts in the measurements for the control of Reference and Test Drugs used in this study were measured as 5.35 µg/ml for the Reference Drug and 9.56 µg/ml for the Test Drug.

The enrofloxacin concentrations measured in plasma samples following the administration of Reference and Test Drugs to the animals in Group 1 and Group 2 are given in Table 1, and the plasma drug concentration-time curve is presented in figure 3. In Table 1 and at 0.8-1.2nd hours following the administration of test Drugs, it is seen that the plasma enrofloxacin concentration reaches the peak value (1.116-1.664 µg/ml); the plasma drug concentration remains at ≥ 0.5 µg/ml for about 4 hours; and that there is 0.04 µg/ml plasma drug concentration at 36th hour.

The pharmacokinetic variances following the intramuscular administration of reference and test drugs to group 1 and group 2 are presented in Table 3.

Table 1. Plasma drug concentrations of enrofloxacin by time

Time (hour)	Enrofloxacin (µg/ml)	
	Reference Drug Group 1	Test Drug Group 2
0.25	0.80 ± 0.24	0.92 ± 0.28
0.5	1.01 ± 0.22	1.22 ± 0.37
1	1.10 ± 0.22	1.614 ± 0.43
2	0.80 ± 0.21	1.56 ± 0.28
4	0.58 ± 0.26	0.93 ± 0.42
8	0.16 ± 0.09	0.33 ± 0.11
12	0.08 ± 0.04	0.14 ± 0.04
18	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02
24	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01
36	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00

Table 2. Some pharmacokinetic variables as a result of logarithmic transformation of reference and test Drugs

Variables	Reference Drug	Test Drug	µT/µR
AUC (µg. hour/L)	0.80 ± 0.45 ^a (0.69-0.94)	1.00 ± 0.40 ^b (0.86-1.11)	1.24
C _{max} (µg/ml)	0.43 ± 0.03 (0.7-0.16)	0.21 ± 0.43 (0.08-0.29)	0.48
Acceptable Limit	0.80-1.25		

Table 3. Pharmacokinetic variances of reference and test drugs

Variables	Reference Drug	Test Drug
AUC (µg. hour/L)	6.54 ± 0.69 ^a (4.87-8.63)	10.33 ± 0.89 ^b (7.23-12.7)
OKS (hour)	17.05 ± 2.23 (9.05-21.45)	24.71 ± 14.19 (9.91-81.47)
α (hour ⁻¹)	0.35 ± 0.05 (0.24-0.53)	0.32 ± 0.04 (0.21-0.46)
β (hour ⁻¹)	0.03 ± 0.00 (0.02-0.07)	0.13 ± 0.88 (0.04-0.49)
k _a (hour ⁻¹)	4.014 ± 0.66 ^a (2.31- 5.38)	1.80 ± 0.23 ^b (1.27-2.61)
t _{1/2} α (hour ⁻¹)	2.09 ± 0.27 (1.30-2.88)	2.29 ± 0.34 (1.48-3.23)
t _{1/2} β (hour)	21.25 ± 3.80 (8.91-31.48)	30.83 ± 15 ^b .15 (14.0-91.4)
t _{1/2} a (hour)	0.01 ± 0.03 ^a (0.11-0.29)	0.408 ± 0.04 ^b (0.26-0.54)
T _{max} (hour)	1.00 ± 0.27 (0.5-2)	1.20 ± 0.20 (1.00-2.00)
C _{max} (µg/ml)	1.12 ± 0.10 (0.85-1.44)	1.66 ± 0.154 (1.91-1.96)

AUC: Area under curve; a,b: The difference between the groups with different letters in the same row is significant (p < 0.05); ca: In absorbed administration, the first degree absorption rate constant; a: Plasma drug concentration diffusion period rate constant; P: Plasma drug concentration elimination period rate constant; t_{1/2}a : in case of oral administration, the half life of absorption from the digestive tract; t_{1/2}α: Diffusion period half life

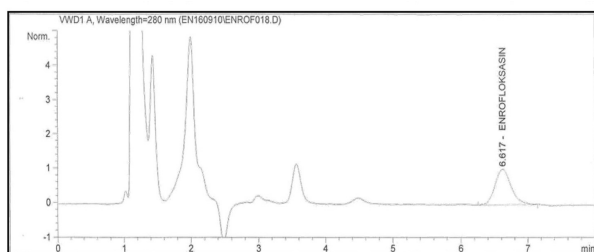


Figure 1. Chromatogram of enrofloxacin active ingredient (20 μ l from 1 μ g/ml solution).

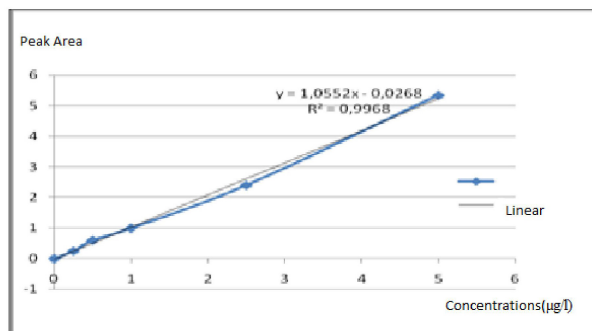


Figure 2. The standard curve prepared using the peak areas in high-pressure liquid chromatography of enrofloxacin at a certain concentration.

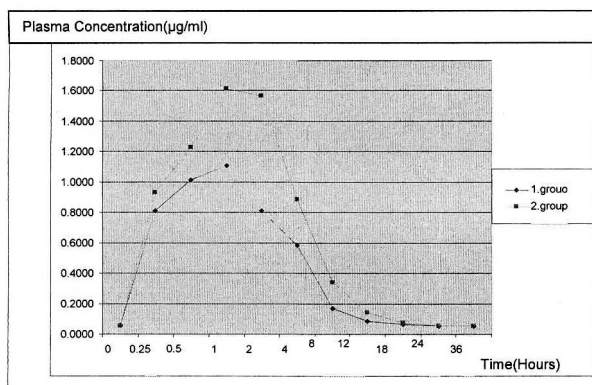


Figure 3. Plasma drug concentration-time curves of enrofloxacin drawn upon intramuscular administration of 2.5 mg/kg reference and test drugs.

DISCUSSION

Many drug preparations of enrofloxacin have a wide area of use in calves. This study regarding the bioequivalence of enrofloxacin has a specific quality as it contributes to bioequivalence research. The results to be obtained are intended to enlighten the research and development studies in this area. In Turkey, there are 382 enrofloxacin drug substances in various formulations which are suitable for parenteral administration in cattle and calves. (Anonymus, 2017) Despite that much preparations; there are no studies available regarding the bioequivalence of this drug in calves.

In the study, the sensitivity of the method was determined as 0.05 μ g/ml for enrofloxacin. In this respect, this value is lower than Anadon et al.'s (Anadon et al. 1995) (0.003 μ g/ml, HPFC); similar to Posyniak et al.'s (Posyniak et al. 2001) (0.02 μ g/ml, HPFC); and higher than Şahan and Kaya's (Şahan and Kaya 2006) (0.1 μ g/ml enrofloxacin; agar gel disk diffusion method) findings. The differences of the analysis method regarding sensitivity may be attributed to the analyses methods of the samples and the

properties of HPFC instrument and the study conditions. In this study, the sensitivity limit of the method was found sufficient as it was possible to measure minimal values (50x) from the lowest effective concentration (<0.5 μ g/ml) of enrofloxacin in the plasma.

The recovery ratio in the study was found as 80-96%. These values were obtained similar to the values determined by Posyniak et al. (2001) and Anadon et al. (1995) in plasma, and by Sumana et al. (2001) in serum (<90%, 87%, 92-97%, respectively). When compared with literature data, it was concluded that the recovery ratios found in the study were suitable enough to render the results reliable.

The area under the curve (AUC) was found 6.54 \pm 0.69 μ g.hour/L for reference drug and 10.33 \pm 0.89 μ g.hour/L for test drug. The AUC value of reference and test drugs administered intramuscularly was determined to be lower than the reference and test drug values found by Posyniak et al. (2001) by oral gastrointestinal administration (18.653 \pm 1.846 μ g.hour/L, 17.934 \pm 1.636 μ g.hour/L, HPFC, respectively), the value found by Elmas et al. (2001) (Group 2 intramuscular 19.07 \pm 0.243; HPFC), the value found by Kaya et al. (1996) (18.395 \pm 2.220 μ g.hour/L for oral gastrointestinal administration for test drugs; 26.91 \pm 7.97 μ g.hour/L, agar gel disk diffusion method); the value found by Parlak and Kaya (2005) (30.7 \pm 4.8 μ g.hour/L for reference drug administered orally through drinking water, 41.3 \pm 3.4 μ g.hour/L and 31.2 \pm 3.5 μ g.hour/L for test drugs; agar gel disk diffusion method).

Tmax of enrofloxacin in plasma was determined as 1.00 \pm 0.27 hours for the reference drug and 1.20 \pm 0.20 hours for the test drug. It was understood that it showed similarity with the value found by Elmas et al. (2001) (Group 2 intramuscular 1.09 \pm 0.28 hours, HPFC). The Cmax was found 1.12 \pm 0.10 μ g/ml for reference drug and 1.66 \pm 0.154 μ g/ml for test drug. In the study, Cmax value for reference and test drugs was determined to be similar to the reference and test drug values of Posyniak et al. (2001) (0.92 \pm 1.105 μ g/ml; 0.98 \pm 0.099 μ g/ml, respectively; gastrointestinal administration, HPFC) and of Anadon et al. (1995) (1.4 μ g/ml; for enrofloxacin administered orally through drinking water; agar gel disk diffusion method); and it was determined to be lower than the value found by Elmas et al. (2000) (Group 2 intramuscular, 3.25 \pm 0.29 μ g/ml, HPFC).

The drugs are accepted as bioequivalent in case the pharmacokinetic variables such as AUC, Cmax, and Tmax of the reference and test drugs are within the range of bioequivalence acceptance limits (0.80-1.25 or 80-125%). As Cmax value shows a wide variability depending on the sampling time, it may be accepted within 70-143% limits (Kayaalp 2008; Tras and Yazar 2002). When AUC and Cmax are evaluated by logarithmic transformation, the value obtained by dividing the AUC value of test drug (1.00 \pm 0.40 μ g.hour/L) by reference drug value (0.80 \pm 0.45 μ g.hour/L) is 1.24. The value obtained by dividing the Cmax value of the test drug (0.21 \pm 0.43 μ g/ml) by the reference drug value (0.43 \pm 0.03 μ g/ml) (μ T/ μ R) is 0.48. The value obtained by dividing the test drug Tmax value, for which logarithmic transformation is not possible as it is a time-dependent parameter, (1.20 \pm 0.20 hours) by the reference drug value (1.00 \pm 0.27 hours) (μ T/ μ R) is 120. When the bioequivalence of the test drug is evaluated, it is seen that the Tmax (μ T/ μ R=120) is within the acceptable limit (80-125%); and the AUC value of test drug when the logarithmic transformation is applied (μ T/ μ R=1.24) is within the acceptable limits (0.80-1.25). However, it is

seen that the Tmax value of the test drug ($\mu\text{T}/\mu\text{R}=148$ is $\mu\text{T}/\mu\text{R}=0,48$ after logarithmic transformation) is not within the acceptable limits.

As a result of evaluating the analyzed pharmacokinetic criteria (AUC, Cmax, Tmax) of reference and test drug products containing enrofloxacin, it was understood that the test drug was not bioequivalent in terms of Cmax, but it was bioequivalent in terms of AUC and Tmax, and that the test drug may be used as substitute for the reference drug. The higher Cmax value of the test drug compared to the reference drug indicates that it is better absorbed at the drug absorption point. This is considered to arise from the failure to adjust the exact dose, individual differences of the animals in the trial group, and from the analysis methods.

CONCLUSION

With this study, it is intended to promote the bioequivalence studies in veterinary drugs and to enlighten the research and development studies based on the results to be obtained. The limited number of the studies conducted in this area also restricts the path to follow, method and the interpretations of the results. Therefore, this study will constitute a resource for the bioequivalence studies in the veterinary field.

REFERENCES

- Anadon A, Martinez-larranaga G A, Diaz M J, Velez B, Biringaz P (1990). Pharmacokinetic and residue studies of quinolone compounds and olaquinolox in poultry. *Ann Res Vet*, 21, 137-144.
- Anadon A, Martinez-larranaga M R, Diaz M J, Bringas P, Martinez M A, Fernandez-cruz M L, Fernandez M C, Fernandez R (1995). Pharmacokinetic and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J Vet Res*, 6, 501-506.
- Bauditz R (1987). Results of clinical studies with Baytril in calves and pigs. *Vet Med Rev*, 2, 122-129.
- Cabanes A, Arboix M, Anton J M G, Reig F (1992). Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits. *Am J Vet Res*, 53, 90-93.
- Davidson J N, Conzelman G M, Baggot J D (1986). Pharmacokinetics of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-3-quinole carboxylic acid (CFPQ) in pre-ruminant and ruminant calves, in Proceedings. *West Pharmacol So*, 29, 129-132.
- Elmas M, Yazar E, Traş B, Baş A L, Eryavuz A (2000). Pharmacokinetics and oral bioavailability of enrofloxacin in faunated and defaunated Angora goats. *Revue Med Vet*, 151(6), 507-510.
- Elmas M, Traş B, Kaya S, Baş A L, Yazar E, Yarsan E (2001). Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in angora goats. *Canadian J Vet Res*, 65(6), 64-67.
- Gkgm (2017). Ruhsatlı Veteriner Tibbi Ürünler. <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/> Accessed: 30.01.2017.
- Hantash T M, Abu-basha E A, Roussan D A, Abudabos A M (2008). Pharmacokinetics and Bioequivalence of Doxycycline (Providox® and Doxyvet 0-50 S®) Oral Powder Formulations in Chickens. *Int J Poult Sci*, 7(2), 161-164.
- Kaartinen L, Pyorala S, Moilanen M, Raisanen S (1997). Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *J Vet Pharmacol Therap*, 20(6), 479-482.
- Kaya S, Baydan, E, Bilgili, A, Yarsan, E, Şeker, Y (1996). Etlik piliçlerde enrofloksasinin farmakokinetiği ve manganla enrofloksasin arasındaki emilme yönünden etkileşimler. *A Ü Vet Fak Derg*, 43 (2), 195-202.
- Kaya S (2000). Farmakokinetik. In: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Eds), 47-123, 2. Baskı, 2.Cilt. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Kaya S (2000). Farmakokinetik. In: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Eds), 267-420, 2. Baskı, 2.Cilt. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Kayaalp S O (2008). Biyoyararlanım ve Biyoşekerlik Araştırması. In: Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler, s: 796-797, 4. Baskı Pelikan Yayıncılık Ltd Şti Ankara.
- Öner L (2003). Değiştirilebilir (interchangeable) ilaç ve biyoşekerlilik. http://www.recete.org/mised/mised_3/9.php/ Accessed: 06.05.2003.
- Parlar A, Kaya S (2005). Etlik piliçlerde enrofloksasin içeren müstahzarların farmakokinetiği. *A Ü Vet Fak Derg*, 52 (2), 99-103.
- Posniyak A, Zmudzki J, Niedzielska J, Biernacki B (2001). Bioequivalence study of two formulations of enrofloxacin following oral administration in chickens. *Bull Vet Inst Pulawy*, 45, 353-358.
- Şahan S, Kaya S (2006). Hidrate sodyum kalsiyum aluminosilikat içeren yemle beslenen etlik piliçlerde enrofloksasinin farmakokinetiği. *A Ü Vet Fak Derg*, 53 (2), 111-115.
- Shumaker R C (1986). PKCALC a basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metabolism Rev*, 17, 331-348.
- Sumano L H, Gutierrez O L, Ocampo C L (2001). Non-bioequivalence of various trademarks of enrofloxacin and Baytril in cows. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 108(7), 311-314.
- Traş B, Yazar E (2002). Bioequivalence as quality, efficacy and safety test for drugs. <http://www.tvhb.org.tr/Dergi/ilackalite.htm/> 2002. Accessed: 06.05.2003.
- Traş B, Yazar E (2002). İlaçlarda kalite, etkinlik ve güvenlik testi olarak biyoşekerlik. *Tvhb Derg*, 2 (3-4), 75-78.
- Toutain P L, Koritz G D (1997). Veterinary drug bioequivalence determination. *J Vet Pharmacol Therap*, 20, 79-90.
- Wagner J G (1979). Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics. Illinois: The Hamilton Press, Inc, USA.





Developing Lateral Flow Assay Based Rapid Diagnosis Kit For Serologic Diagnosis of Cattle Brucellosis

Osman Yaşar TEL Oktay KESKİN Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Şanlıurfa, Turkey

Received: 19.06.2017

Accepted: 10.10.2017

SUMMARY

Brucellosis caused by microorganisms of *Brucella* genus is a worldwide zoonotic infection seen in livestock and has serious risk for human and animal health and negative effect on animal production. The disease agents infect especially genital organs like uterus, testes, mammary glands and cause abortion and infertility in livestock. The aim of this study was to develop a rapid lateral flow test (LFT) for diagnosis cattle brucellosis. Sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of LFT were evaluated by comparing the results with Rose Bengal Plate Test (RBPT), complement fixation test (CFT) and i-ELISA. Out of 91 serum samples 45 (49.5%), 44 (48.3%), 37 (40.7%) and 34 (37.4%) were found positive by RBPT, i-ELISA, CFT and LFT, respectively. Based on the results by CFT as reference test, sensitivity and specificity of LFT were found 92% and 100%, respectively. As conclusion, LFT and RBPT gave similar results and it was thought that LFT is an easy, rapid and specific screening test for diagnosis cattle brucellosis in the field.

Key Words: Lateral Flow Assay, Cattle, Serologic diagnosis, Brucellosis

ÖZET

Sığır Brusellozunun Serolojik Teşhisinde Lateral Flow Temelli Hızlı Tanı Kiti Geliştirilmesi

Bruselloz, sığır, koyun, keçi, domuz ve koç gibi çiftlik hayvanlarında brusella grubu mikroorganizmaların sebep olduğu özellikle, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek, yavru atmalara ve infertiliteye neden olan dünyanın birçok ülkesinde görülen insan ve hayvan sağlığını tehdit eden ve hayvansal üretim üzerine negatif etkileri olan önemli bir zoonozdur. Bu çalışma ile sığır brusellozisinin serolojik olarak çabuk tanısında kullanılacak bir LFT (Lateral flow test)'i geliştirmek amaçlandı. LFT'nin sensitivite, spesifisite ve tanısal doğruluğu, RBPT (Rose Bengal Plate Test), KFT (Komplement Fiksasyon Test) ve i-ELISA ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İncelenen 91 serum örneğinin 44 (%48.3)'ü i-ELISA ile 34 (%37.4)'ü LFT, 45'i (%49.5) RBPT ile 37 (%40.7)'si KFT ile pozitif olarak saptandı. Komplement fiksasyon testi referans test kabul edilerek, LFT'nin sensitivitesi %92 ve spesifitesi %100 olarak bulundu. Sonuç olarak, LFT'nin, sığır brusellozun serolojik teşhisinde sahada kolayca uygulanabilecek hızlı sonuç alınan spesifik bir test olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Lateral Flow Test, Sığır, Serolojik teşhis, Bruselloz

GİRİŞ

Bruselloz, gerek insan ve hayvan sağlığı, gerekse ekonomik kayıplar açısından dünyanın en yaygın zoonoz hastalıkları arasında sayılmakta ve ülkemizde de en önemli hastalıklar arasında bulunmaktadır. Bruselloz, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyanın en yaygın zoonozlarından biri olarak kabul edilmektedir (Corbel 1997; Greenfield ve ark. 2002; OIE 2009; Aydın 2012).

Brucella enfeksiyonunun laboratuvar tanısında serolojik, bakteriyolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Etken izolasyonun zor ve uzun sürmesi ve insanlara

bulaşma riskinin olması nedenleri ile teşhiste daha çok serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Hastalığın serolojik teşhisinde OIE tarafından önerilen testler, tarama testi olarak Rose Bengal pleyt test (RBPT) ve teyit edici olarak komplement fiksasyon testi (KFT)'dir (OIE 2009). Kullanılan diğer testler, indirekt ve kompetitif ELISA ve Floresan polarizasyon testleridir (Nicoletti 1969; Ruppner ve ark. 1980; Saravi ve ark. 1995; Nielsen 2002; McGiven ve ark. 2003; OIE 2009). Komplement Fiksasyon testi, altın standart olarak kabul edilen ve OIE tarafından önerilen resmi bir serolojik testtir. Ancak KFT için özel ekipman, deneyimli personel gerekmesi ve testin zorluğundan kaynaklanan nedenlerden dolayı, son yıllarda insan ve hayvan sağlığında brusellozun teşhisi için LFT'leri

başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Smits ve ark 2003; İrmak ve ark. 2004; Abdoel ve ark. 2008; Shome ve ark. 2015). Membran temelli Lateral Flow İmmunokromatografik testler, ilk olarak gebelik testi olarak geliştirilen, antijen-antikor ilişkisine dayanan saha kullanımına uygun hızlı tanı testleridir (Wong ve Tse 2009). Hızlı, spesifik deneyim ve ekipmana ihtiyaç göstermeyen, kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Beş µL serum örneği kullanılarak 10-15 dakika içinde sonuç alınabilmektedir. Son yıllarda LFT anthraks, PPR, bruselloz, tüberküloz gibi birçok hastalık için geliştirilmiştir (Abdoel ve ark. 2008; Kaewphinit ve ark. 2013; Cox ve ark 2015; Cheng ve ark. 2017).

Bu çalışmada, sığır brusellozunun hızlı tanısı amacıyla LFT'nin geliştirilerek, sonuçların KFT, i-ELISA ve RBPT ile karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Saha serum örnekleri

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı serum koleksiyonunda bulunan bruselloz yönünden KFT pozitif ve bazılarında etken izolasyonunun yapıldığı infekte sürülerden elde edilen 37 pozitif ve brusella infeksiyonu yönünden akredite ari sürülerden elde edilen 54 negatif olmak üzere toplam 91 adet sığır serumu Lateral Flow testinin sensitivite ve spesifitesinin saptanmasında kullanıldı.

i-ELISA ve LFT için Smooth Lipopolisakkarit (S-LPS) Antijeni hazırlanması

Brucella abortus S99 suşu serum dektroz agarın bulunduğu Roux şişelerine ekilip 5 gün süre ile 37°C'de inkübe edildi. Koloni formu kontrolü yapılarak, uygun bulunan kültürler fizyolojik tuzlu su içinde toplandı. Toplanan kültürler santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak, altta kalan sediment toplandı. Yaklaşık 50 gram ağırlığındaki bakteriyel miktarına 170 ml distile su katılarak elde edilen süspansiyon 66 °C'ye ayarlanmış su banyosunda inaktive edildi. Daha sonra 190 ml fenol (%90'lık v/v) katılarak, karışım 66 °C'de 15 dakika süre ile sürekli karıştırıldı ve 15.000 g'de 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Altta kalan kahverengi fenol tabakası atılarak hücre debrisleri Whatman No:1 filtre kağıdından süzüldü. Smooth lipopolisakkarit (S-LPS) 500 ml soğuk metanolün katılması ile presipite edildi. Presipitat 10.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmesinin ardından alınarak bu presipitata 80 ml distile su katıldı ve 18 saat süre ile karıştırıldı. Daha sonra 10.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüje edilerek süpernatant 4 °C'de tutuldu. Presipitat 80 ml distile suda tekrar süspansiyon edildi ve 4 °C'de 2 saat daha karıştırılarak ve santrifüj ile elde edilen süpernatant ilk elde edilen süpernatant ile birleştirildi. Daha sonra elde edilen 160 ml LPS solüsyonuna 8 gram triklorasetik asit eklendi. Bu solüsyon 10 dakika karıştırıldıktan sonra santrifüj edilerek presipitat ayrıldı ve üstte kalan saydam solüsyon distile suya karşı dialize edilerek antijen olarak kullanıldı.

Serolojik Testler

RBPT: Alton ve ark. (1988)'nin bildirdikleri yöntemle yapıldı. Bunun için bir damla test serumu (30 µl) eşit miktarda RBPT antijeni ile plastik pleytlerde karıştırılarak sonuçlar 4 dakika içinde okundu. Karışımı takiben görülen herhangi bir derecedeki aglütinasyon pozitif olarak değerlendirildi.

Komplement Fiksasyon Testi (KF): Alton ve ark. (1988)'nin bildirdikleri yöntemle yapıldı. Veronal buffer solüsyonundan (VBS) mikropleyt üzerinde B ve H arasındaki kuyucuklara 25'er µl konuldu. Test edilecek

serum A, B ve H kuyucuklarına 25'er µl ilave edildi. Antijen A'dan G'ye kadar 25'er µl ve komplement de A'dan H'ye kadar olan kuyucuklara 25'er µl konuldu. Mikropleytle bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün koyun eritrositleri (%2) ve amboseptörden oluşan hemolitik sistem A'dan H kuyucuğuna kadar 50'şer µl ilave edildi ve 37 °C'de yarım saat inkübasyona tabi tutuldu. Ayrıca mikropleyt 45-90 dk süre aralığında +2/+8 °C'de bekletildi. Mikropleytle kuyucuklarında meydana gelen lizise göre pozitiflik saptandı. KFT için mililitresinde 20 ve üzeri uluslararası komplement fiksasyon test birimi (UKFTB) içeren serum dilüsyonları pozitif olarak kabul edildi.

i-ELISA: i-ELISA için antijen olarak *B. abortus* S99 susundan elde edilen LPS antijen olarak kullanıldı. Kullanılacak antijen ve konjugatın optimum dilüsyonları belirlendi. Bunun için karşılıklı titrasyonları yapıldı; pozitif ve negatif serum arasında en büyük farkı oluşturan dilüsyonlar optimum olarak seçildi. Hazırlanan ELISA solid faz antijeni, antijen kaplama tampon solüsyonu (0.05M sodyum karbonat, pH 9.6) ile, konsantrasyonu antijen ve konjugat dilüsyonlarının optimizasyonunda belirlenen oranda olacak şekilde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) tüm kuyucuklarına 100 µl olarak taksim edildi ve pleytler 4 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Pleytler %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) ile 5 kez yıkandı. PBS/T içinde 1/100 oranında dilüsyonları yapılmış pozitif ve negatif serumlar 100 µl olarak her serum numunesinden ikişer kez olmak üzere pleyte konuldu ve pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile inkübasyonları yapıldı. Pleytler tekrar 5 kez yıkandıktan sonra horseradish peroxidase ile işaretlenmiş protein A/G konjugatı belirlenen oranda PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100'er µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 5 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (pH 4.5 olan 0.05 M sitrat tamponu içinde OPDS tabletler-Sigma) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 450 nm'de absorbans değerleri okundu. Testin eşik değeri negatif serum optik değer ortalamasına 3 standart sapma eklenerek belirlendi.

Lateral Flow Testi: Bu test, aşağıda aşamaları anlatıldığı şekilde uygulandı.

Kolloidal goldun hazırlanması: 5 ml %1'lik hydrogen tetrachloroaurate trihydrate (SIGMA-ALDRICH) solüsyonu 500 ml distile su ile karıştırılarak kaynatılana kadar ısıtıldı. Beş ml yeni hazırlanmış %1'lik sodyum sitrat solüsyonu gold solüsyonuna katıldı ve renk kırmızıya dönünceye kadar kaynatıldı ve 5 dakika daha kaynatıldıktan sonra solüsyon 4 °C'de siyah renkli bir şişe içerisinde saklandı (Frens 1973).

Kolloidal gold problemlerinin hazırlanması: Optimum konsantrasyonu belirlenerek uygun oranda sulandırılan tavşanda hazırlanmış anti-sığır IgG (H+L) antikorları kolloidal gold solüsyonuna eklenerek karıştırıldı ve oda ısısında 20-40 dakika inkübe edildi. Daha sonra sodyum borat içerisinde hazırlanan %10 (w/v) BSA 1/10 oranında eklenerek oda ısısında 10-15 dakika bekletildi. Karışım 15.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra pelet sodyum borat ile süspansiyon edilerek konjugat olarak kullanıldı.

İmmunokromatografik test sitriplerinin hazırlanması: LFT için farklı reagentlar için farklı porozitedeki pedler birleştirildi. Bu amaçla örnek uygulama pedi, kolloidal gold konjugatı içeren konjugat pedi, test ve kontrol hatlarını

bulunduran nitroselüloz membran ve bir absorban ped kullanıldı. Konjugat ped için glass fiber membran kullanılırken, örnek ve absorban ped içinse selüloz membran kullanıldı. Çeşitli por çaplarındaki nitroselüloz membranlar denenerek uygun olan membrana karar verildi. Glas fiber pede konjugat, nitroselüloz membrana test çizgisi için Brucella-LPS antijeni, kontrol çizgisi için sığır IgG antikorları (SIGMA) uygulandıktan sonra kurutuldu. Daha sonra bu pedler ve membran birleştirilerek kesildi ve elde edilen stripler uygun plastik kasetlere yerleştirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

LFT'nin uygulanması: Örnek pedine 10µl serum uygulandı. Serumun kapillar difüzyon ile konjugat pedi boyunca yayılması ve gold konjugatı rehidre ederek, konjugat ile etkileşime girmesi için 1 dakika beklendi. 130 µl koşturma sıvısı eklenip, gold konjugat ve serumdaki antikorların kontrol ve test hatlarına doğru ilerlemeleri sağlanarak test gerçekleştirildi. Pozitif sonuçta belirgin iki kırmızı-mor çizgi oluşurken, negatif sonuçta tek bir kırmızı-mor çizgi görüldü (Şekil 1).

İstatiksel analiz : LFT'nin sensitivite ve spesifitesi KFT gold standart kabul edilerek hesaplandı (Saha ve ark. 2010).

Tablo 1. LFT ve konvansiyonel serolojik test sonuçları

Table 1. LFT and conventional serological test results

Test Sonucu	RBPT n (%)	KFT n (%)	LFT n (%)	i-ELISA n (%)
Pozitif	45 (49.5)	37 (40.7)	34 (37.4)	44 (48.3)
Negatif	46 (50.5)	54(59.3)	57(62.6)	47 (51.7)
Toplam	91 (100)	91 (100)	91 (100)	91(100)

Tablo 2. Test edilen serumların serolojik testlere verdiği yanıtlar

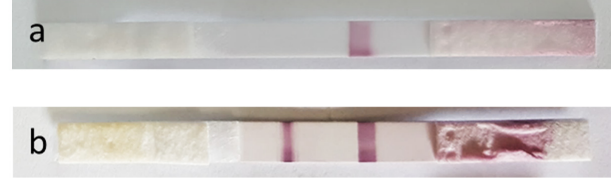
Table 2. Responses of test sera in serological tests

Serum sayısı	RBPT	i-ELISA	KFT	LFT
44	-	-	-	-
34	+	+	+	+
5	+	+	-	-
3	+	-	-	-
3	+	+	+	-
2	-	+	-	-

Tablo 3. Çalışmada kullanılan serolojik testlerin sensitivite ve spesifitelerinin karşılaştırılması

Table 3. Comparison of sensitivity and specificity of the serological tests used in the study

Serolojik testler	Sensitivite (%)	Spesifite (%)
RBPT	100	87
i-ELISA	100	88
LFT	92	100



Şekil 1. Lateral flow testi a. Negatif sonuç b. Pozitif sonuç

Figure 1. Lateral Flow test a. Negative result b. Positive result

BULGULAR

Çalışmada kullanılan 91 adet kontrol serumu optimum miktarlarda antikor ve antijen ile hazırlanan LFT stripleri yanında i-ELISA, RBPT ve KFT ile test edildi. İncelenen 91 serum örneğinin 44 (%48.3)'ü i-ELISA ile, 45 (%49.5)'i RBPT ile, 37 (%40.7)'si KFT ile, 34 (% 37.4)'ü LFT ile pozitif sonuçlar verdi (Tablo 1).

Çalışmada kullanılan 44 serum tüm testler ile negatif bulunurken 34 serum örneği tüm testler ile pozitif bulundu. Üç serum örneği sadece RBPT ile ve 2 serum örneği sadece i-ELISA ile pozitif yanıt verirken 3 serum örneği LFT hariç diğer testlerin tümü ile pozitif yanıt verdi (Tablo 2).

Çalışmada, RBPT ve i-ELISA'nın sensitivitesi %100 bulunurken LFT'nin %92 bulundu. Bunun yanında LFT'nin spesifitesi %100 bulunurken RBPT ve i-ELISA'nın spesifitesi sırasıyla %87 ve %88 olarak bulundu (Tablo 3).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bruselloz dünyanın birçok ülkesinde görülen insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren bulaşıcı, akut, subakut veya kronik seyirli zoonoz bir enfeksiyöz hastalıktır. Ekonomik yönden yavru atma, perinatal mortalite, infertilite, süt ve et üretiminde azalma, tıbbi harcamalar, gibi nedenlerle hayvancılık endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Alton 1990). Bunun yanında bruselloz, insanlara da bulaşarak önemli bir halk sağlığı problemi de oluşturmaktadır (Yüce ve Alp-Çavuş 2006; TC Sağlık Bakanlığı 2014). LFT, ekipman ve deneyim gerektirmeden kolayca uygulanabilecek bir testtir. Bu test buzdolabına ihtiyaç duymadan uzun süre saklanabilir. Sonuçlar hemen çıplak gözle görülmektedir. Bu çalışmada laboratuvarında hazırlanan LFT'nin, KFT, i-ELISA ve RBPT ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada incelenen sığır serum örneklerinden 7 serum örneği i-ELISA ile, 8 serum örneği RBPT ile pozitif olarak belirlenirken, bu serumlar KFT'de negatif olarak belirlendi. Öte yandan 11 serum örneği RBPT ve 10 serum örneği i-

ELISA'da pozitif saptanırken, bu serumlar LFT ile negatif bulundular. Bu serumların daha spesifik olan KFT ve LFT'de negatif olarak saptanmasının nedeni, RBPT ve i-ELISA gibi yüksek sensitiviteye sahip olan testlerde diğer bakterilerden kaynaklanan (*Yersinia enterocolitica* O:9, *E. coli* O116:H21, O157:H7, *Francisella tularensis*, kauffman-white grup N *Salmonella* türleri, *Pseudomonas maltophilia* ve *Vibrio cholerae*) çapraz reaksiyonların daha fazla saptanabilmesidir. i-ELISA ve LFT sonuçları arasındaki bu farklılığın ise bu testlerde antijen olarak kullanılan LPS molekülünün solid yüzeylere bağlanma özelliklerinin farklı olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, i-ELISA testi antikorların bütün sınıflarını, RBPT hem IgG hem de IgM antikorlarını saptayabilmektedir. Bu nedenle bu testlerin sensitivitesi yüksek olarak görülmekle birlikte spesifitesi sınırlıdır (Alton ve ark. 1988; Blasco 1994; OIE 2009). Bu çalışmada da benzer bir şekilde, i-ELISA ve RBPT'nin sensitivitesi %100 olarak bulunurken LFT'nin sensitivitesi %92 olarak bulundu. Bunun yanında, LFT nin spesifitesi %100 bulunurken, i-ELISA ve RBPT'nin spesifitesi sırası ile %88 ve %87 olarak saptandı. Abdoel ve ark. (2008), sığır brusellozunun serolojik teşhisinde LFT geliştirdikleri çalışmada testin %90 sensitivite ve yüksek spesifiteye sahip olduğunu, Smits ve ark. (2003), insanlar için immunokromotografik test geliştirdikleri çalışmada da testin %96 sensitivite ve %99 spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların bildirdiği bulgular ile bu çalışmada elde edilen bulgular oldukça benzerdir. RBPT'in LFT ile aynı sürelerde sonuç vermesine rağmen, yüksek spesifitesi nedeni ile LFT'nin tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Zira, LFT de kullanılan antijen LPS iken, RBPT'de tüm bakteridir. Bu da yanlış pozitifliklerin LFT de daha az görülmesinin nedenidir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada (Shome ve ark. 2015) LFT'nin sensitivitesini %87.1 ve spesifitesini %92.6 olarak bulunmuştur. Nijerya'da yapılan bir çalışmada (Kaltungo ve ark. 2013), araştırmacılar RBPT, SAT-EDTA ve LFT kullanarak brusellozun seroprevalansını sırası ile %25.8, %11.1 ve %2.5 olarak bulmuşlardır. Görüldüğü üzere LFT diğer testlerden daha az duyarlı görülmekle beraber bunun derecelerinde olan farklılık muhtemelen kullanılan antijenin tipi, saflık derecesi ve membrana bağlanma kapasitesi ile yakından ilişkilidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, serum örneklerinin incelenmesi sonucunda, KFT'ine göre LFT'nin spesifitesi %100 ve sensitivitesi %92 olarak bulundu. LFT'in kolay uygulanabilirliği ve 5-10 dakika gibi kısa sürede hızlı sonuç vermesi, diğer testlere göre daha ucuz olması, veteriner klinikleri ya da köy koşullarında bir damla serum ile brusellozun tanısını kısa sürede koyabileceği ve RBPT'ine alternatif bir test olarak brusellozun teşhisinde sahada kullanılabileceği sonucuna varıldı. LFT'nin kullanılması sonucunda da hayvanlarda kolay ve ucuz olarak hastalığın teşhis edilmesi ile bir an önce gerekli kontrol tedbirlerin alınması olanak vereceği, bu nedenle gerek hayvan, gerekse insan sağlığı açısından önem taşıdığı kanaatine varıldı.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Harran Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 14129 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdoel T, Dias IT, Cardoso R, Smits HL (2008). Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. *Vet Microbiol*, 30(3-4), 312-319.
- Alton GG (1990). *Brucella melitensis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K, Duncan JR (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 383-409.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Inra, Paris; pp 63-136.
- Aydın E (2012). Brusella Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. IV. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu (Gıda Kaynaklı Zoonozlar), Sempozyum kitabı, 57-62.
- Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenez De Bagues MP, Cau C (1994). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec*, 134, 415-420.
- Cheng S, Sun J, Yang J, Lv J, Wu F, Lin Y, Liao L, Ye Y, Cao C, Fang L, Hua Q (2017). A new immunoassay of serum antibodies against peste des petits ruminants virus using quantum dots and a lateral-flow test strip. *Anal Bioanal Chem*, 409(1), 133-141.
- Cox CR, Jensen KR, Mondesire RR, Voorhees KJ (2015). Rapid detection of *Bacillus anthracis* by γ phage amplification and lateral flow immunochromatography. *J Microbiol Methods*, 118, 51-56.
- Corbel MJ (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3(2), 213-221.
- Frens G (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 241(105), 20-22.
- Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze BS (2002). Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am J Med Sci*, 323, 299-315.
- Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, Smits HL (2004). Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg*, 70, 688-694.
- Kaewphinit T, Arunrut N, Kiatpathomchai W, Santiwatanakul S, Jaratsing P, Chansiri K (2013) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. *Biomed Res Int*. Vol: 2013, ID: 926230, 1-6.
- Kaltungo BY, Saidu SNA, Sackey AKB, Kazeem HM (2013). Serological evidence of brucellosis in goats in Kaduna North senatorial district of Kaduna State, Nigeria. *ISRN Veterinary Science*, Vol: 2013, ID: 963673, 1-6.
- McGiven J, Tucker J, Perrett L, Stack J, Brew S, MacMillan A (2003). Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *J Immunol Methods*, 278(1), 171-178.
- Nicoletti P (1969). Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Amer J Vet Res*, 30(10), 1811-1816.
- Nielsen K (2002). Diagnosis of Brucellosis by serology. *Vet Microbiol*, 90(1), 447-459.
- OIE (2009). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth Edition, Caprine And Ovine Brucellosis Page:1022-1030.
- Ruppanner R, Meyer M, Willeberg P, Behymer D (1980). Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with other tests for Brucellosis, using sera from experimentally infected heifers. *Am J Vet Res*, 41(8), 1329-1332.
- Saha PK, Ali MH, Rahman MB, Islam MA (2010). Determination of sensitivity and specificity of in-house sandwich ELISA for the detection of infectious bursal disease viruses. *Bangl J Vet Med*, 8(2), 97-106.
- Saravi MA, Wright PF, Gregoret RJ, Gall DEJ (1995). Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet Immunol and Immunopathology*, 47(1), 93-99.
- Shome R, Filia G, Padmashree BS, Krithiga N, Sahay S, Triveni K, Rahman H (2015). Evaluation of lateral flow assay as a field test for investigation of brucellosis outbreak in an organized buffalo farm: A pilot study. *Veterinary world*, 8(4), 492-496
- Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R (2003). Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 1141-1146.
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2014). 2004-2006 İstatistikler / Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü çalışma yılı. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-2952/istatistik-yilliklari.html>, Erişim tarihi: 18.03.2014.
- Wong R C, Tse HY (2009). Lateral Flow Immunoassay. Humana Press. New York, USA.
- Yüce A, Alp-Çavuş S (2006). Türkiye'de bruselloz: Genel bakış. *Klin Derg*, 19(3), 87-97.



Prevalance of Rotavirus, Coronavirus, Cryptosporidium spp., Escherichia coli K 99, and Giardia lamblia pathogens in neonatal calves with diarrheic in Siirt Region

Süleyman KOZAT¹ İshan TUNCAY²

¹ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Institute of Health Science, Department of Veterinary Internal Medicine, Van, Turkey

Received: 01.06.2017

Accepted: 22.11.2017

SUMMARY

This paper aimed to study the incidence determine the prevalence of Rotavirus, Coronavirus, *Escherichia (E.) coli* K-99, *Cryptosporidium* and *Giardia* in fecal samples collected from different localities covering in Siirt. The animal material of this study consisted of 100 diarrheic calves of different ages, races and genders and 10 healthy calves. Stool specimens were obtained from diarrheic calves that underwent systematic clinical examinations. Blood samples were also taken from V. jugularis according to the method for hematological analysis. During routine clinical examinations, increases in body temperature, heart rate and respiratory rate were determined in the diarrheic calves. WBC, Hct, Neu, MCH and Hb values of hematological parameters were statistically significant (respectively $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.05$) when compared to the control healthy calves. When stool specimens examined by rapid diagnostic test; 4% Rotavirus, 5% Rotavirus+*E. coli*, 6% *E.coli*, 12% Rotavirus+*Cryptosporidium*, 10% *Cryptosporidium*, 4% Rotavirus+*Giardia* and 7% *E. coli* + Corona enterogenous pathogens were detected in the diarrheic calves and the ratios of other factors were 52%. As a result, data on the presence and distribution of enterogenic pathogens causing diarrhea in newborn calves in Siirt region were revealed and it was concluded that Siirt region will provide a light for future scientific studies on diarrhea and it was concluded that a light has been shed on future scientific studies on diarrheic calves in Siirt.

Key Words: Diarrhea, Newborn calf, Prevalence

ÖZET

Siirt Yöresindeki Yenidoğan İshalli Buzağılarda Rotavirus, Coronavirus, Cryptosporidium Spp, Escherichia coli K 99 ve Giardia lamblia Etkenlerinin Prevalansı*

Bu çalışma, Siirt yöresindeki yenidoğan ishalleri buzağılarda Rotavirus, Coronavirus, *Escherichia (E.) coli* K-99, *Cryptosporidium* ve *Giardia lamblia* etkenlerinin prevalansını belirlemek amacıyla yapıldı. Bu çalışmanın hayvan materyalini; farklı yaş, ırk ve cinsiyette 100 ishalleri buzağı ile 10 sağlıklı olmak üzere 110 buzağı oluşturdu. Sistemik olarak klinik muayeneleri yapılan ishalleri buzağılardan dışkı örnekleri alındı. Hematolojik analizler için yöntemine uygun olarak V. jugularis'den kan örnekleri alındı. Yapılan rutin klinik muayenelerde ishalleri buzağılarda beden ısısı, kalp frekansı ve solunum sayısında artış belirlendi. Hematolojik parametrelerden WBC, Hct, Neu, MCH ve Hb konsantrasyonları sağlıklı buzağılarda aynı parametrelerine göre istatistiksel olarak (sırasıyla $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.01$, $p<0.05$ ve $p<0.05$) yüksek tespit edildi. Hızlı diagnostik testle dışkı örnekleri incelendiğinde; ishalleri buzağılarda %4 Rotavirus, %5 Rotavirus+*E. coli*, %6 *E. coli*, %12 Rotavirus+*Cryptosporidium*, %10 *Cryptosporidium*, %4 Rotavirus+*Giardia* ve %7 *E. coli*+Coronavirus enterojen patojenleri ve %52 diğer faktörler tespit edildi. Sonuç olarak Siirt yöresinde yenidoğan ishalleri buzağılarda ishale neden olan enterojen patojenlerin varlığı ve dağılımı hakkında veri ortaya konuldu ve Siirt yöresinde ishalleri buzağılarda ilgili gelecekte yapılacak olan bilimsel çalışmalara ışık tutacağı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: İshal, Yenidoğan Buzağı, Prevalans

GİRİŞ

İshal, enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz nedenlere bağlı olarak meydana gelen ve dışkıının içerdiği sıvı miktarının, volumünün ve atılım sıklığının artışı ile karakterize bir

semptomdur (Roy 1980). Yenidoğan buzağılarda ishalleri seyreden hastalıklar yüksek ölüm oranına ve gelişme geriliğine neden oldukları için çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Ranjan ve ark. 2006). Hastalığın etiyopatogenezi farklı ve komplekstir (Cho ve

Yoon 2014). Mikrobiyolojik, immunolojik, nutrisyonel, genetik, çevresel ve yönetimsel pek çok faktör hastalığa neden olmaktadır (Roy 1980).

Buzağılarda birçok enfeksiyöz etken ishale neden olmakla birlikte, yaşamın ilk haftalarında genellikle Rotavirus, Coronavirus, *E. coli* ve *Cryptosporidium spp.* lerin mono veya miks enfeksiyonlarından ileri gelen ishaller rastlanılmaktadır (Kozat 2000). İshal; gerek ülkemizde ve gerekse tüm dünyada buzağuların en önemli sorunlarından biridir. Özellikle doğumu takip eden 2-10 gün içerisinde ve yaygın olarak da neonatal dönemde (doğumdan sonraki 3-4 hafta) görülmektedir (Virta ve ark. 1996; Özkan ve ark. 2011). Buzağı ishallerinin oluşumunda; viral, bakteriyel ve paraziter etkenlerin yanı sıra barınak koşullarının elverişsiz olması (Gulliksen ve ark. 2009), hayvan bakıcılarının eğitim düzeyinin düşüklüğü, yeterli düzeyde kolostrumun verilmemesi, göbek kordonun dezenfeksiyonun yapılmaması, hastalığın kontrolünün zor olması gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Kozat 2000). İshal; yenidoğan buzağılarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmekte ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Walker ve ark. 1998; Constable ve ark. 2001).

Ülkemizde hayvancılık sektöründe sağlıklı buzağı elde edilmesi ve buzağının hastalıklardan korunması için geniş ölçekte çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle buzağı isheline neden olan etiyolojik faktörlere yönelik birçok bilimsel araştırma bulunmaktadır (Kozat 2000; Özkan ve Akgül 2004; İçen ve ark. 2013). Yeni doğan buzağılarda ishal; profilaksi ve sağaltıma rağmen günümüzde de yaygın olarak görülmekte ve doğrudan ölümlere, gelişmede duraklama ve sağaltım giderleri ile de dolaylı ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Cho ve Yoon 2014).

Buzağı ishallerinin yüksek mortalite oranı ile seyretmesi; etiyolojik faktörlerin çok karmaşık olması nedeniyle etkili bir tedavi yapılmasının zorluğu ve sıvı-elektrolit tedavisinin yeterli, düzenli ve doğru yapılmamasına bağlıdır. Yenidoğan buzağı ishallerinin oluşumunda tek bir nedenin rol oynamadığı ve multifaktörel bir yapıya sahip olduğu rapor edilmektedir (Çabalar ve ark. 2000; Özkan ve Akgül 2004). Bu etkenler arasında; *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*), *Camphylobacter jejuni*, *Chlamydia spp.* gibi entoropatojenik bakteri türleri, Rotavirus, Coronavirus gibi viruslar, Coccidia, *Cryptosporidium*, *Giardia* gibi paraziter etkenler, çevresel faktörler, bakım ve beslenme bozuklukları, enzim noksanlıkları ve buzağının immünolojik durumunun rol oynadığı bildirilmiştir (Snodgrass ve ark. 1986; Kozat 2000; Kalınbacak 2003; Murat ve Balıkçı 2012).

Yenidoğan buzağılarda ishale neden olduğu kayıpların azaltılması için etiyolojik faktörlerin hızlı bir şekilde tanımlanması için etiyolojik faktörlerin etkin tedaviye önemli bir katkı sağladığı belirtilmektedir (Kalınbacak 2003; Murat ve Balıkçı 2012).

Bu çalışmada; gerek seçilen alan, gerekse araştırılan konunun ilk olmasının yanı sıra; Siirt ilinde yenidoğan buzağılarda verim kayıplarına ve ölümlere neden olan ishal faktörlerin tespit edilmesi ve belirlenen bu faktörlere yönelik mücadele edilmesine olanak sağlanması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmanın hayvan materyalini; Siirt ili merkez ve ilçelerindeki işletmelerde bulunan ve ishal şikayeti olan 0-90 günlük yaşta, farklı ırk ve cinsiyete sahip 100 adet ishali buzağı ile 10 sağlıklı kontrol grubu buzağı olmak

üzere toplam 110 buzağı oluşturdu. Çalışmaya alınan sağlıklı ve ishali buzağuların rutin klinik muayeneleri yapıldı. Çalışmanın materyali doğumları uygun olduğu şubat, nisan ve mayıs aylarında toplandı. Klinik muayenede buzağuların habitus, deri elastikiyeti, gözlerin orbita çukurluğundaki konumu, konjunktiva, mukozaların renk ve nemliliği, beden sıcaklığı, nabız sayısı ve ritmi, emme refleksi, dışkının renk, koku ve kıvamı değerlendirilerek buzağular dehidrasyon derecelerine göre hafif, orta ve şiddetli derecede dehidrasyonlu olarak sınıflandırıldı (Şentürk 2012). Bu çalışmada 100 kit prosedüre göre kullanılarak sonuçlar elde edildi. İshali buzağulardan dışkı toplama kaplarına dışkı örnekleri alındı. Alınan dışkı örneklerinden Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium*, *E. coli* K99 ve *Giardia lamblia* etkenlerinin varlığı hızlı diagnostik ticari test kitleri (BovİD-5 Ag Test Kit-BIONOTE, KOREA) ile belirtilen prosedüre göre tespit edildi. Çalışmaya alınan buzağular için Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nda (05.05.2016 tarihli ve 2016/04 nolu karar) izin alındı.

Klinik muayene yapıldıktan sonra ishali buzağılarda vena jugularisten kan örnekleri alındı. Antikoagulanlı tüplere alınan kan örneklerinden lökosit sayısı (WBC), eritrosit sayısı (RBC), hemoglobin konsantrasyonu (Hb), hematokrit değeri (Hct), nötrofil yüzdesi (%), nötrofil sayısı (Neu), ortalama eritrosit hacim (MCV), ortalama hemoglobin (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerleri veteriner hematoloji cihazıyla (QBC vetautoreader@-Idexx) ölçüldü.

Buzağuların dehidrasyon derecesine bağlı olarak sıvı tedavisi uygulandı. Buzağulara gerektiği kadar laktatlı ringer, izotonik %0.9 NaCl, %5 dekstroz serumlar intavenöz olarak verildi. Ayrıca tetrasiklin, sefalosporin, enrofloksasin ve trimetropin gibi antibiyotikler ile tedavi edildi. Destekleyici olarak buzağuların durumuna göre vitamin C, vitamin K preparatları ve epitel yıkımlanmasına karşı A vitamini preparatları uygulandı.

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; Ortalama ve Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Bu özelliklerden bazıları için normal dağılımdan sapmalar gözlemlendiğinden, ishali grupları karşılaştırılarda bir yönlü varyans analiz (One-way) testi kullanılırken (Tablo2), her iki grubu (ishali ve sağlıklı) karşılaştırmada bağımsız t-testi kullanılmıştır (Tablo 5). Gerekli istatistiksel analizlerde istatistikî yazılım SPPS (ver: 21) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Çalışma alanı olarak seçilen Siirt ili ve ilçelerinde bakılan ishali buzağuların bulunduğu ahırların çoğunun eski geleneksel usullere göre yapıldığı tespit edildi. İlin sosyo-ekonomik yapısı göz önüne alındığında, hayvan bakıcılarının eğitim düzeyinin düşük, gebe ineklerin kuru dönemin yeterli düzeyde olmadığı, buzağulara yeterli düzeyde kolostrumun verilmediği, göbek kordonun dezenfeksiyonun yapılmadığı ve daha çok aile tipi işletmeler olduğu gözlemlendi. Çalışmaya alınan ishali buzağılarda Rotavirus, Coronavirus, *E.coli*, *Cryptosporidium spp.*, ve *Giardia* tespit edildi. Ancak ishal görülen vakaların annelerinin gebelikteki kuru dönemin yeterli düzeyde olmadığı, buzağulara yeterli düzeyde kolostrumun verilmediği, göbek kordonun dezenfeksiyonun yapılmadığı, nutrisyonel yetersizlik, çevresel ve yönetimsel gibi faktörlerden kaynaklanacağı düşünüldüğü çalışmada diğer faktörler olarak adlandırıldı.

İshalli buzağuların klinik muayenelerinde değişen derecelerde dehidrasyon bulguları, defakasyon sıklığı, dışkıının su kapsamında ve hacminde artış, gözün orbita çukurluğuna çöküşü, deriye yapılan kıvrımın düzelleme süresi, çevreye karşı ilgileri, ayakta durma yetenekleri,

perineal bölge ve kuyruğa bulaşmış dışkı görüntüleri, ishallerin çoğunda kötü kokulu dışkı, buzağularda depresyon, emme refleksinde azalma ve ishalin süresi gibi klinik bulgular gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 1. İshalli buzağuların dehidrasyon derecesine göre klinik bulguları

Table 1. Clinical findings according to degree of dehydration in calves with diarrhea

Dehidrasyon Derecesi (%)	Göz Küresinin Orbitaya Çökme Boyutu (+)	Deri Elastikiyeti (Kıvrımda düzelleme-sn)	Mukoz Membranlar ve Genel Durum	Ekstremitelerdeki Isı ve İdrar Çıkışı
4 -6 Hafif dehidrasyon	Belirgin Değil	3-4 sn.	Hafif depresyon, nemli-pembe mukozal membran	Normal ısı, idrar çıkışında azalma, Hayvan ayakta
7-8 Orta dehidrasyon	++	5-6 sn.	Depresyon, hayvan ayakta, burun ucu ve mermede kuruma	Nabız dolgunluğunda azalma, ısı normal, idrarda çıkışında azalma, zayıf duruş
9-10 Şiddetli dehidrasyon	+++	7-10 sn.	Yatar durumda, emme refleksinde azalma, burun ucu ve mermede kuruma.	Zayıf nabız, ekstremiteler soğuk, sterno-abdominal yatış.

++: 0.5 cm; +++: 0.5-1 cm, sn: saniye

Tablo 2. İshalli buzağularının dehidrasyon derecesine göre klinik bulgular

Table 2. Clinical findings according to degree of dehydration in calves with diarrhea

Parametreler	İshal Düzeyi		
	Hafif (n=42)	Orta (n=30)	Şiddetli (n=28)
Yaş (gün)	26.83±14.84 ^b	45.43 ±20.62 ^a	26.93±25.94 ^b
Kalp Frekansı (vurum/dakika)	124.08 ±17.92 ^a	97.81 ±13.87 ^b	87.60 ±12.37 ^b
Solunum Sayısı (sayı/dakika)	36.22 ±6.39 ^a	36.05 ±9.09 ^b	30.07 ±4.37 ^b
Beden ısı (°C)	38.74 ±0.82 ^c	38.70±1.15 ^b	37.04±1.77 ^b

a,b,c, Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir

ab:p<0.01;

cb:p<0.05;

Tablo 3. İshalli buzağuların dehidrasyon derecelerine göre etkenlerin dağılımı

Table 3. Distribution of factors according to dehydration grades in calves with diarrhea

Etkenler	Dehidrasyon Derecesi			TOPLAM
	Hafif (n=42)	Orta (n=30)	Şiddetli (n=28)	
Rotavirus	4	0	0	4
Rotavirus+E. coli	0	3	2	5
E. coli	6	0	0	6
Rotavirus+Cryptosporidium	0	6	6	12
Cryptosporidium	6	4	0	10
Rotavirus+Giardia	0	2	2	4
E. coli+Corona	0	4	3	7
Diğer Faktörler	30	12	10	52
Toplam	46	31	23	100

Tablo 4. İshalli buzağuların il bazında etiyolojik dağılımı**Table 4.** Etiologic distribution of diarrheal calves according to province

Etkenler	Siirt Merkez	Gökçebağ Beldesi	Tillo	Şirvan	Eruh	Baykan
Rotavirus	2	0	0	0	2	0
Rotavirus+E. coli	2	1	2	0	0	0
E. coli	2	0	0	2	0	2
Rotavirus+Cryptosporidium	4	4	0	2	2	0
Cryptosporidium	8	0	2	0	0	0
Rotavirus+Giardia	0	0	2	2	0	0
E. coli+Coronavirus	0	2	0	2	3	0
Diğer Faktörler	26	6	4	4	6	6

Tespit edilen ishallerin dehidrasyon derecelerine göre kalp frekansı, solunum sayısı, beden ısı gibi klinik bulgular Tablo 2’te verildi. İstatiksel analizine göre hafif dehidrasyonlu buzağularda kalp atım sayısı, solunum sayısı beden ısı yüksek tespit edildi ($P<0.01$) (Tablo 2).

Elde edilen istatistiksel analizlere göre; hafif dehidrasyonlu olan 42 buzağının 12’sinde tek enterojen etken tespit edilirken, 30’unda ise bakılan kitteki etkenler dışında etkenlerin rol oynadığı saptandı. Orta derecede dehidrasyonlu olan 30 buzağının 18’inde miks enterojen etkenler tespit edilirken, 12’sinde ise bakılan kitteki etkenler dışında etkenlerin rol oynadığı saptandı. Şiddetli derecede dehidrasyonlu olan 28 buzağının 18’inde miks enterojen etkenler tespit edilirken, 10’unda ise bakılan kitteki etkenler dışında etkenlerin rol oynadığı saptandı. Hızlı diagnostik test sonuçlarına göre; ishallerde buzağularda %4 Rotavirus, %5 Rotavirus+E. coli, %6 E. coli, %12 Rotavirus+Cryptosporidium, %10 Cryptosporidium, %4 Rotavirus+Giardia ve %7 E. coli+Coronavirus enterojen patojenleri ve %52 diğer faktörler tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 5. Sağlıklı ve ishalleri buzağuların hematolojik parametreleri**Table 5.** Hematological parameters in healthy and calves with diarrhea

Parametreler	İshalleri (n=100)	Sağlıklı (n=10)
WBC (m/mm ³)	29.9±25.7 ^a	13.79±3.4 ^b
RBC (m/mm ³)	10.5±2.5 ^b	9.9±1.4 ^b
Hb (g/dl)	13.7±2.9 ^c	10±1.3 ^b
Hct (%)	48.0±11.1 ^a	37.9±3.9 ^b
Neu(%)	48.8±21.4 ^a	26.3±5.8 ^b
Neu (m/mm ³)	10.6±6.1 ^a	5.64±1.1 ^b
MCV(f1)	42.1±4.4 ^c	38.4±3.3 ^b
MCH(pg)	13.4±3.2 ^c	12.1±1.1 ^b
MCHC(g/dl)	31.8±4.8 ^b	31.5±1.4 ^b

a,b,c, Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir **ab:** $p<0.01$; **cb:** $p<0.05$

İshallerde buzağularda enteropatojen etkenler incelendiğinde 4 buzağıda Rotavirus, 6 buzağıda E. coli, 10 buzağıda cryptosporidium saptanırken, 5 buzağı Rotavirus+E. coli, 12 buzağıda Rotavirus+Cryptosporidium, 4 buzağıda

Rotavirus+Giardia, 7 buzağıda E. coli+Coronavirus miks seyrettiği belirlendi (Tablo 3).

Çalışmaya alınan ishalleri buzağuların Siirt ili merkez ve ilçelerinde ishallerde rol oynayan etkenlerin il bazında dağılımı Tablo 4’te verildi.

İstatistiksel analizlere göre ishalleri buzağuların hematolojik bulgularından WBC, Hb, Hct, Neu (%), Neu, MCV ve MCH konsantrasyonları sağlıklı buzağuların aynı parametrelerine göre istatistiksel olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.01$; $p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.05$) (Tablo 5).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yenidoğan buzağularda ishal; yüksek morbidite ve mortalite ile seyrettiğinden dolayı (Walker 1998) dünya genelinde buzağı ölümlerinin ve aynı zamanda sığırcılık endüstrisinin finans kayıplarının başlıca sebeplerinden biri olduğu bildirilmektedir (Von Buenau ve ark. 2005). Bütün gelişmelere rağmen yenidoğanlarda ishal vakalarının görülme oranı %50’den yüksek olduğu ve ishallerle ilgili buzağı ölüm oranının %1.5-8 arasında değiştiği rapor edilmektedir (Frank ve Kaneene 1993). Ülkemizde buzağı ishalleri yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden, tedavi masraflarının yüksek olması, performans düşüklüğü ve ölüm nedeni ile önemli ekonomik kayıplara yol açan bir problem olarak güncelliğini korumaktadır (Uzlu ve ark. 2010). Buzağı ishallerinin yüksek mortalite oranı ile seyretmesi, etiyolojik faktörlerin çok karmaşık olması nedeniyle, etkili bir tedavi yapılmasının zorluğu ve sıvı-elektrolit tedavisinin yeterli, düzenli ve doğru yapılmamasına bağlıdır (Kozat 2000). Yenidoğan buzağı ishallerinin oluşumunda tek nedenin rol oynamadığı ve multifaktöriyel bir etiyolojinin de rol oynadığı rapor edilmektedir (Cho ve Yoon 2014). Bu etkenler arasında; E. coli, Salmonella spp., Cl. perfringens, Campylobacter jejuni, Chlamydia spp. gibi entropatojenik bakteri türleri, Rotavirus, Coronavirus gibi viruslar, Coccidia, Cryptosporidium, Giardia gibi parazitler etkenler, çevresel faktörler, bakım ve beslenme bozuklukları, enzim noksanlıkları ve buzağının immünolojik durumunun rol oynadığı bildirilmiştir (Snodgrass ve ark. 1986; Kozat 2000; Kalınbacak 2003; Murat ve Balıkcı 2012).

İshal; buzağı yetiştiriciliğinde neonatal dönem hastalıkları içerisinde önemli sorun olarak güncelliğini korumakta olup ve buzağularda gelişme geriliği (Gulliksen ve ark. 2009), ölümler ve tedavi masrafları nedeniyle gerek ülkemizde (Kozat 2000) ve gerekse dünyada önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Radostits ve ark.

2008). Bu kayıpların, buzağı ishallerine neden olan etmenlerin hızlı bir şekilde belirlenmesi ve etkili bir tedavi ile en aza indirilebileceği belirtilmektedir (Kalinbacak 2003).

Yenidoğan ishalleri buzağılarda hematolojik parametreleri ilgili yapılan çalışmalarda hematokrit değeri (Constable ve ark. 1996), eritrosit sayısı, total lökosit sayısı nötrofil sayısı ve hemoglobin değerlerinde yükselme görüldüğü ve lökositozisin, gastrointestinal enfeksiyona karşı vücudun reaksiyonu sonucu oluştuğu bildirilmektedir (Seridhar ve ark. 1998). Başka bir çalışmada ise ishalleri buzağılarda dehidrasyon derecesi ile Hct değeri arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu, dehidrasyon şiddetinin Hct değerinden belirlenebileceğini bildirmektedirler (Constable ve ark. 1996). Bu çalışmada ishalleri buzağıların total lökosit sayısı ve hemoglobin değerleri sağlıklı buzağıların total lökosit sayısı ve hemoglobin değerlerine göre yüksek tespit edildi. Bu veriler araştırmacıların verileriyle paralellik arz ettiği belirlendi (Karademir ve Sendil 2001; Özkan ve Akgül 2004). Aynı zamanda bu çalışmada MCV ve MCH değerlerindeki artışlar hemoglobinin konsantrasyonundaki artıştan kaynaklanmaktadır.

Rotavirüs, Bovin Coronavirüs (BCoV), *E. coli* F5 ve *Cryptosporidium* türleri uluslararası düzeyde genç buzağılarda akut ishallerin en önemli enteropatojenleri olarak kabul edilmektedir (Gulliksen ve ark. 2009). Ishalleri buzağılarda Coronavirus ve Rotavirüs enfeksiyonlarının teşhisi genellikle gaitada virusun ya da virus antijenlerinin varlığının saptanması esasına dayanmaktadır (Alkan 1998). *E. coli* K99/F5 1-4 günlük buzağılarda genellikle ishale sebep olurken, Rotavirüs, Coronavirus ve *Cryptosporidium parvum* çoğunlukla 1-4 haftalık buzağılarda ishale sebep olur. Yenidoğan buzağılarda ishallerin prevalansı *E. coli* için %2.6-45.1, Rotavirüs için %17.7-79.9 ve *Cryptosporidium parvum* %27.8-63 arasında değiştiği rapor edilmektedir (Meganck ve ark. 2014). Ülkemizde değişik zamanlarda ve değişik yörelerde yenidoğan ishalleri buzağıların etkenlerinin prevalansı ile ilgili olarak pek çok araştırma yapılmıştır (Çabalar ve ark. 2000; Eskiizmirliler ve ark. 2001; Özkan ve ark. 2001; Al ve Balıkcı 2012; Arslan ve ark. 2015). Van ilinde %17.97 Rotavirüs, %1.12 Coronavirus (Çabalar ve ark. 2007), Kars yöresinde %69.3 *E. coli* ve %5.94 *Cryptosporidium* spp., %17.8 Rotavirüs (Aydın ve ark. 2001), %33.6 oranında Rotavirüs (Yazıcı ve Akça 1993), %53 Rotavirüs bulduklarını rapor etmektedirler (Burgu ve ark. 1995). Çalışmamızda ishalleri buzağılarda %4 Rotavirüs, %5 Rotavirüs + *E. coli*, %6 *E. coli*, %12 Rotavirüs + *Cryptosporidium* %4 Rotavirüs+*Giardia* ve %7 *E. coli*+Coronavirus enterojen patojenleri tespit edildi. Elde ettiğimiz veriler bazı araştırmacıların (Çabalar ve ark. 2007), verileriyle benzerlik gösterirken, bazı araştırmacıların (Yazıcı ve Akça 1993; Burgu ve ark. 1995) verilerden düşük bulundu. Elde edilen oranlardaki değişimlerde bölgesel farklılıklar, barınak koşulları ve hayvan bakıcıların bilinç düzeyi rol oynamaktadır.

Cryptosporidium parvum ve *Giardia intestinalis* hayvanların bağırsaklarda yaygın olarak bulunan parazitlerdir (Değerli ve ark. 2005). *Cryptosporidium* yenidoğan ve genç buzağılarda ishale neden olan önemli protozoal bir parazittir (Değerli ve ark. 2005; Brook ve ark. 2008). *Cryptosporidium* tedavisi zor olup, ishalleri ve ishalleri olmayan hayvanlarda bulunabilmektedir (İçen ve ark. 2013). Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda buzağılarda, *Cryptosporidium* spp. oookistlerine Ankara'da %35.8, Karacabey harasında %26.7, Elazığ'da %7.2 ve Erzurum'da %22.8 oranlarında tespit etmişlerdir (Al ve Balıkcı 2012). Hakkari yöresinde yapılan bir araştırmada

ise *Cryptosporidium* spp. oookisti en fazla 3-6 aylık buzağılarda (%31.70), en az ise 12-36 aylık sığırlarda (%11.76) tespit ettiklerini bildirmektedirler (Göz ve ark. 2007). Bu çalışmada ishalleri buzağılarda ishalleri etkenleri incelendiğinde, 10 buzağıda *Cryptosporidium* saptanırken 12 buzağıda Rotavirüs+*Cryptosporidium* belirlendi (Tablo 5). Belirlenen bu oranlar araştırmacıların (Al ve Balıkcı 2012) Erzurum için verilen oranlara yakın bulunurken, diğer yöredeki oranlara göre düşük bulundu. Araştırmamızda bu oranların yüksek olmasının nedeni ise çalışmaya alınan ishalleri buzağıların çoğunun yaşça bir aylıktan büyük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada *Cryptosporidium* kaynaklı ishalleri buzağılarla ilgili sayısal değeri araştırmacıların *Cryptosporidium* ilgili verilerini desteklemektedir (Göz ve ark. 2007).

Bu araştırmada ise Siirt yöresinde hızlı diagnostik testle dışkı örnekleri incelendiğinde; ishalleri buzağılarda %4 Rotavirüs, %5 Rotavirüs+E. coli, %6 *E. coli*, %12 Rotavirüs+*Cryptosporidium*, %10 *Cryptosporidium*, %4 Rotavirüs+*Giardia* ve %7 *E. coli*+Coronavirus enterojen patojenleri tespit edildi. Ancak hızlı tanı kitindeki etkenler dışında tespit edilmeyen ve ishalleri görülen vakalarda nutrisyonel, genetik, çevresel ve yönetimsel gibi pek çok faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada hızlı tanı kitindeki etkenler dışında tespit edilmeyen nedenler diğer faktörler olarak değerlendirildi. Çalışmamızda ishalleri buzağılarda tespit edilen etkenlerin oranı diğer faktörlere göre düşük bulundu. Bu durumun buzağı ishallerinin oluşumunda; viral, bakteriyel ve paraziter etkenlerin yanı sıra barınak koşullarının elverişsiz olması (Gulliksen ve ark. 2009), hayvan bakıcılarının eğitim düzeyinin düşüklüğü, yeterli düzeyde ve zamanında kolostrumun verilmemesi, göbek kordonunun dezenfeksiyonun yapılmaması, hastalığın kontrolünün zor olması gibi birçok faktörden kaynaklanmaktadır (Kozat 2000).

Sonuç olarak; Siirt yöresinde yeni doğan ishalleri buzağılarda ishale neden olan enterojen patojenlerin varlığı ve dağılımı hakkında bir veri ortaya konuldu ve elde edilen bu verilerle Siirt yöresinde ishalleri buzağılarla ilgili gelecekte yapılacak olan bilimsel çalışmalara ışık tutacağı kanısına varıldı

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-5162 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alkan F (1998).** Buzağı ishallerinde rotavirüs ve coronavirusların rolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 45, 29-37.
- Al M, Balıkcı E (2012).** Neonatal ishalleri buzağılarda rotavirüs, coronavirus, *E. coli* K99 ve *Cryptosporidium parvum*'un hızlı test kitleri ile teşhisi ve enteropatojen ile maternal immünite ilişkisi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 26 (2), 73 - 78.
- Arslan MÖ, Kırmızıgül AH, Parmaksızoğlu N, Erkiş EE (2015).** *Eimeria zuernii* ile doğal enfekte buzağılarda kış coccidiosisi olgusu. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 10(3), 193-197.
- Aydın F, Umur Ş, Gökçe G, Genç O, Güler MA (2001).** Kars yöresindeki ishalleri buzağılardan bakteriyel ve paraziter etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 7(1), 7-14.
- Brook E, Hart CA, French N, Christley R (2008).** Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Vet Parasitol*, 152(1), 46-52.
- Burgu İ, Akça Y, Kan F, Özkul A, Karaoğlu T (1995).** Yenidoğan ishalleri buzağılarda rotavirüslerin electron mikroskopi (EM), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) teknikleri ile çabuk teşhisi ve antijenik karakterizasyonu. *AÜ Vet Fak Derg*, 42, 491-498.

- Cho YI, Yoon KJ (2014).** An overview of calf diarrhoea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci*, 15, 1, 1-17.
- Constable PD, Thomas E, Boisrime B (2001).** Comparison of two or electrolyte solutions for the treatment of dehydrated calves with experimentally-induced diarrhoea. *Vet J*, 162(2), 129-140.
- Constable PD, Gohar H M, Morin DE, Thurmon JC (1996).** Use of hypertonic saline-dextran solution to resuscitate hypovolemic calves with diarrhoea. *Am J Vet Res*, 57(1), 97-104.
- Çabalar M, Voyvoda H, Sekin S (2000).** Virologic and serologic examinations for rotaviruses in diarrhoeic calves. *YYÜ Vet Fak Derg*, 11, 18-21.
- Çabalar M, Kaya A, Arslan S (2007).** Yeni doğan buzağların ishal olgularında rotavirus ve coronavirus araştırılması. *Vet Bil Derg*, 23(3-4), 103-106.
- Değerli S, Çeliksöz A, Kalkan K, Özçelik S (2005).** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves in Sivas. *Turk J Vet Anim Sci*, 29(4), 995-999.
- Frank NA, Kaneene JB (1993).** Management risk factors associated with calf diarrhoea in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci*, 76(5), 1313-1323.
- Uzlu E, Karapehlivan M, Çitil M, Gökçe E, Erdoğan H M (2010).** İshal semptomu belirlenen buzağlarda serum sialik asit ile bazı biyokimyasal parametrelerin araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(2), 83-86.
- Eskiizmirli SN, Öncel T, Beyazıt A, Mısırhoğlu OZ (2001).** Türkiye'nin değişik illerindeki ishallerde buzağlarda rotavirus, coronavirus ve cryptosporidiosis yayılımı. *Vet Hek Mikrobiy Derg*, 2, 35-42.
- Göz Y, Gül A, Aydın A (2007).** Hakkari yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium* sp.'nin yaygınlığı. *YY Üniv Vet Fak Derg*, 18(2), 37-40.
- Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Hammes I, Løken T, Åkerstedt J, Østerås O (2009).** Enteropathogens and risk factors for diarrhoea in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*, 92 (10): 5057-5066.
- İçen H, Arserim N, Işık N, Özkan C, Kaya A (2013).** Prevalence of four enteropathogens with immunochromatographic rapid test in the feces of diarrhoeic calves in east and southeast of Turkey. *Pak Vet J*, 33(4), 496-499.
- Kalınbacak A (2003).** İshallerde buzağların sıvı sağaltımında hipertonic salin-dextran ve oral elektrolit solüsyonunun kullanımı. *AÜ Vet Fak Derg*, 50, 113-118.
- Karademir B, Sendil CE (2001).** *E. coli*'nin neden olduğu ishallerde buzağlarda klinik, hematolojik, biyokimyasal bulgular ve sağaltım uygulamalarının etkinliği. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 7(2), 175-183.
- Kozat S. (2000).** İshallerde buzağlarda kristalloid (laktatlı ringer) ve koloidal + kristalloid (% 6 dekstran - 70 + laktatlı ringer) infüzyon solüsyonlarının rehidratasyon etkinliği. Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Meganck V, Hoffack G, Opsomer G (2014).** Advances in prevention and therapy of neonatal dairy diarrhoea: a systematic review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Vet Scand*, 56(1), 75.
- Murat A, Bahkçı E (2012).** Neonatal ishallerde buzağlarda rotavirus, coronavirus, *E. coli* K99 ve *Cryptosporidium parvum*'un hızlı test kitleri ile teşhisi ve enteropatogen ile maternal immünite ilişkisi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 26(2), 73-78.
- Özkan C, Akgül Y (2004).** Neonatal ishallerde buzağlarda hematolojik, biyokimyasal ve elektrokardiyografik bulgular. *YY Ü Vet Fak Derg*, 15 (1-2), 123-129.
- Özkan C, Altuğ N, Yüksek N, Kaya A, Akgül Y (2011).** Assessment of electrocardiographic findings, serum nitric oxide, cardiac troponins and some enzymes in calves with hyperkalemia related to neonatal diarrhoea. *Revue Méd Vét*, 162(4), 171-176.
- Özkan M, Gıcık Y, Metin H, Sarı B (2001).** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in diarrhoeic calves in Kars Province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 161-164.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2008).** Veterinary medicine, 10th edition. Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Saunders Elsevier.
- Ranjan R, Nares R, Patra RC, Swarup D (2006).** Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhoea in calves. *Vet Res Commun*, 30(3), 249-254.
- Roy JHB (1980).** Factors affecting susceptibility of calves to disease. *J Dairy Sci*, 63(4), 650-664.
- Seridhar, Pachauri SP, Kumar R (1998).** Clinicopathological alterations in calf scour. *Indian Vet J*, 65, 771-774.
- Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campell I, Menzies JD (1986).** Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec*, 119, 31-34.
- Şentürk S (2012).** Olgu Tartışmalı Buzağların İç Hastalıkları. F Özsan Matbaacılık San ve Tic Ltd Şti, Genişletilmiş İkinci Baskı.
- Virta AM, Mechor GD, Gröhn YT, Erb HN (1996).** Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. *JAVMA*, 208(12), 2043-2046.
- Von Buenau R, Jaekel L, Schubotz E, Schwarz S, Stroff T, Krueger M (2005).** *Escherichia coli* strain nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhoea. *J Dairy Sci*, 88(1), 317-323.
- Walker PG, Constable PD, Morin DE, Drackley JK, Foreman JH, Thurmon JC (1998).** A reliable, practical, and economic protocol for inducing diarrhoea and severe dehydration in the neonatal calf. *Can J Vet Res*, 62(3), 205-213.
- Yazıcı Z, Akça Y (1993).** Buzağlarda rotavirus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi ve ELISA testi ile rotavirus antijenlerinin identifikasyonu. *AÜ Vet Fak Derg*, 40, 231-240.



The Effects of Acidified Sodium Chlorite and Acidified Sodium Chlorite Containing Sauce on *Listeria monocytogenes* in Chicken Chops

Halil YALÇIN¹ Işıl AYDIN² Ali ARSLAN³

¹ Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene & Technology, Burdur, Turkey

² Agriculture and Rural Development Support Institution, Elazığ, Turkey

³ Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene & Technology, Elazığ, Turkey

Received: 02.06.2017

Accepted: 08.11.2017

SUMMARY

This study was aimed to investigate the effects of acidified sodium chlorite (ASC) and ASC containing sauce on chicken chops contaminated with *Listeria monocytogenes*. Chicken chops were experimentally contaminated with *L. monocytogenes*. For the bacterial inhibition, the chops were treated with sauce, ASC (200 ppm and 1800 ppm) and ASC containing sauce. The groups are planned according to the proportions of decontaminants applied and the estimated shelf life of the product. Contaminated 8 groups chops (1 group contaminated control) were placed in plastic containers, and kept at 4 °C for 7 days. The samples were investigated in terms of *L. monocytogenes* at 0, 2, 3, 5 and 7 days. It was determined that there was statistically significant difference between groups in terms of number of *L. monocytogenes*. The highest decrease in number of *L. monocytogenes* was determined in group 6 on day 7 as 1.85 log₁₀cfu/g. In this study, the highest antimicrobial effect on *L. monocytogenes* was found in chicken chops kept after holding it for 2 minutes in solution containing 1800 ppm ASC. In conclusion, ASC solution decreases the risk of *L. monocytogenes* in chicken chops.

Key Words: Acidified Sodium Chlorite, Chicken Chop, Decontamination, *Listeria monocytogenes*, Sauce

ÖZET

Asidifiye Sodyum Klorid ve Asidifiye Sodyum Klorid İçeren Sosun Broiler Pirzolarında *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkisi

Bu çalışmayla *Listeria monocytogenes* ile kontamine edilen broiler pirzolarında asidifiye sodyum klorit (ASK) ve asidifiye sodyum klorit içeren sosun etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Broiler pirzoları *L. monocytogenes* ile deneysel olarak kontamine edilmiştir. Broiler pirzoları bakteriyel azalma için ASK (1200 ppm ve 1800 ppm) ve ASK içeren sos ile muamele edilmiştir. Gruplar, uygulanan dekontaminantların oranlarına ve ürünün tahmini raf ömrüne göre planlanmıştır. Kontamine edilen 8 grup (1 grup kontaminasyon kontrol) plastik kaplara yerleştirilerek at 4 °C'de 7 gün depolanmıştır. Gruplar uygulanan dekontaminantların oranlarına ve ürünün tahmini raf ömrüne göre planlanmıştır. Örnekler 0, 2, 3, 5 ve 7 günlerinde *L. monocytogenes* açısından incelenmiştir. *L. monocytogenes* sayısı açısından gruplar arasında farkın istatistiksel bakımdan önemli olduğu belirlenmiştir. *L. monocytogenes* açısından en büyük azalma 1.85 log₁₀ kob/g ile depolamanın 7. gününde 6. grupta (1800 ppm ASK içeren solüsyon) belirlenmiştir. Bu çalışmada broiler pirzolarında *L. monocytogenes* üzerine en büyük etkinin 1800 ppm ASK içeren solüsyonda 2 dk bekletilmesiyle sağlanmıştır. Sonuç olarak ASK broiler pirzolarında *L. monocytogenes* riskini azaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Asidifiye Sodyum Klorid, Broiler Pirzolası, Dekontaminasyon, *Listeria monocytogenes*, Sos

INTRODUCTION

The broiler carcass can be contaminated during slaughtering, scalding, defeathering, laying open, evisceration, cooling, splitting and packaging by personnel, water or devices-equipment (Arslan 2002). While central parts of meats obtained from healthy animals are sterile, outer parts may be contaminated with microorganisms

depending on butchery hygiene (Mead 2004a). Because *Listeria monocytogenes* is one of the principle causative agents in foodborne diseases, it was chosen for the contamination of the material in our study. This bacteria is a gram-positive and facultative intracellular foodborne pathogen that causes listeriosis (Martín et al. 2014). The low microbiological limits are important for broiler meats kept in cold because these bacteria can reproduce at

refrigerator temperature. For people whose bowel systems are sensitive, *L. monocytogenes* leads to encephalitis, septicemia and meningitis. Moreover, it leads to abort, congenital malformations and stillbirth in pregnant women (Pickering et al. 2012; Ahmed et al. 2015). It was emphasized that red and broiler meats in USA constitute the group with highest risk in terms of *L. monocytogenes*. Among samples obtained from sales points; *E. coli* O157:H7 was detected in 7% of turkeys and 12% of broilers while 24% of broiler carcasses and 12% of pre-cooked products were found to be positive in terms of *L. monocytogenes* (Mead 2004b).

Previous studies (Border et al. 1990; Mead 2004a), showed that more than 50% of processed broiler meats are positive in terms of *L. monocytogenes* while there are generally low numbers of *L. monocytogenes* uncooked broiler meats (<1 cfu/cm²-skin). Presence of *L. monocytogenes* in foods and food processing locations was previously reported in Ireland (Leong et al. 2014). Yang et al. (2016) reported that presence of *L. monocytogenes* in fried meat was 2.47%.

For decontamination of broiler carcasses, biological and chemical materials and physical methods are used. Although many materials were tried for this purpose, only some of them have gained implementation fields in industry (Hwang and Beuchat 1995; Rodríguez-de-Ledesma et al. 1996; Mead 2004a;). Acidified sodium chlorite (ASC) is prepared by adding any acid into liquid sodium chloride solution. In America, Food and Drug Administration (FDA) approved the usage of ASC solution (500-1200 ppm) in final products for decontamination in red meats (USFDA 1998).

Natural food additives are generally more preferable in regard to food safety and this idea becomes more popular (Kim and Rhee 2013). Nowadays, many food matters are treated by sauces containing antimicrobial plants. For this reason, the aim of this study is to determine the effects of sauces containing plant material on the proliferation of *L. monocytogenes*.

This research was conducted in order to examine the effects of ASC and ASC containing sauce on *L. monocytogenes* in chicken chops which are experimentally contaminated.

MATERIALS and METHODS

In this research, 100 g-weight chicken chops were used. The samples were obtained from local markets. Chops were separated from skin and bones but not put into decontamination tank. Eight groups were clustered in research, one was control. The control group was formed from the contaminated chops without any decontamination processing. Research was repeated for 3 times and 40 pcs of chicken chops were used at each repeat. As decontamination material, sodium chloride (25% solution, Merck 8.14815) and citric acid (Merck 242.1000) were used. Solutions of ASC were prepared according to description of Özdemir et al. (2005). In our preliminary study showed that sauce groups containing 1200 ppm ASC had no sufficient antibacterial effects. For this reason, ASC was applied in the dose of 1800 ppm. Dose of ASC at 1800 ppm was used in some groups to evaluate the difference between the dose group of 1200 ppm which is the upper recommended limit for ASC in the USA and some other countries (USFDA 1998).

For sauce, the amounts and content of mixture is as follows; tomato paste (200 g), paprika paste (200 g),

sunflower oil (180 ml), garlic (140 g), red pepper (15 g), thyme (15 g), black pepper (5 g), cumin (5 g), salt (45 g), natural lemon juice (195 ml).

By taking 2.64 ml of 1200 ppm ASC solution, it was placed in containers with 500 g chicken chops and 50 g sauce (10% of the weights of chops) mixture, and then mixed. In order to prepare the sauce containing 1800 ppm ASC 3.96 ml of solution which was covered to 250 ml was taken. The rest of process was same with those above. These solutions prepared were used in 10 minutes.

RSKK 472 *L. monocytogenes* 1/2b, RSKK 474 *L. monocytogenes* 3a, RSKK 475 *L. monocytogenes* 4b, RSKK 476 *L. monocytogenes* 4c and RSKK 02028 *L. monocytogenes* strains obtained from Refik Saydam Public Health Center were used in research. Target contamination level on chop surfaces was 10⁶-10⁷ cfu/g, the contaminated solution containing 10⁷-10⁸ cfu/ml *L. monocytogenes* (mixture of 5 strains) were applied on all of chop surfaces with sterile brush. After inoculation, the chops were held for 4 min to provide adhesion of the pathogen to the surface. Then, in order to determine the level of contamination, samples were taken and microbiological inoculation was conducted. The groups without ASC implementation were placed in polyethylene containers after being kept in ASC solution for 2 minutes and then containers were closed. All of the groups were kept at 4 °C for 7 days. Samples were investigated in terms of *L. monocytogenes* at 0, 2, 3, 5, and 7 days.

The groups were formed as the following; 1) control (contaminated with 5 strains, without ASC or sauce application), 2) the sauce without any ASC was applied, 3) kept for 2 minutes in solution containing 1200 ppm ASC, 4) kept for 2 minutes in solution containing 1200 ppm ASC and then sauce was applied, 5) the sauce with 1200 ppm ASC was applied, 6) kept for 2 minutes in solution containing 1800 ppm ASC, 7) kept for 2 minutes in solution containing 1800 ppm ASC and then sauce was applied, 8) the sauce with 1800 ppm ASC was applied.

Analysis of chops was performed according to the method of USDA-FSIS (2002). The pH values of the samples were measured in order to investigate the microbial load with respect to the changes in pH values. pH values of samples (at 25±1 °C) were determined (at 0, 2, 3, 5 and 7 days) through pH-meter (pH2001, JP Selecta, Spain). Statistical Analysis was conducted by using Statistical Analysis System (SAS) package software (Version 8, 1999, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data was subjected to variance analysis (ANOVA). Averages were parsed according to the method of Fisher's Least Significant Difference-LSD. Statistical significance was determined as P<0.05.

RESULTS

The effects of ASC and the sauce against *L. monocytogenes* on chicken chops were given in Table 1. In general, the differences between groups were found to be significant (P<0.05). In groups 6 and 7, significant difference was determined between day 0 and other days (P<0.05). In other 6 groups, no difference was determined among the storage days (P>0.05). The highest decrease was found in group 6 with value of 1.85 log₁₀cfu/g on day 7 whereas, the lowest decreased was found in group 4 with value of 0.10 log₁₀cfu/g on day 7 (Table 1). The effect of ASC might be decreased by sauce. The pH values determined during storage in groups contaminated with *L. monocytogenes* are given in Table 2.

Table 1. The Effects of acidified sodium chlorite and sauce on *Listeria monocytogenes* in chicken chops during storage at 4 °C (log₁₀cfu/g, n=120)

Storage Days	GROUPS							
	1 st group	2 nd group	3 rd group	4 th group	5 th group	6 th group	7 th group	8 th group
0.	6.83 ± 0.18 ^{Ax}	6.54 ± 0.15 ^{ABx}	6.00 ± 0.18 ^{ABx}	5.76 ± 0.23 ^{Bx}	6.39 ± 0.15 ^{ABx}	6.02 ± 0.79 ^{ABx}	5.59 ± 0.41 ^{Bx}	6.46 ± 0.15 ^{ABx}
2.	7.08 ± 0.34 ^{Ax}	6.77 ± 0.33 ^{ABx}	5.86 ± 0.03 ^{Bx}	5.37 ± 0.14 ^{BCx}	6.83 ± 0.10 ^{Ax}	4.17 ± 0.15 ^{Cy}	4.93 ± 0.11 ^{Cy}	6.61 ± 0.45 ^{ABx}
3.	7.11 ± 0.51 ^{Ax}	6.64 ± 0.34 ^{ABx}	5.25 ± 0.08 ^{BCx}	5.83 ± 0.06 ^{Bx}	6.85 ± 0.37 ^{Ax}	4.39 ± 0.05 ^{Cy}	4.32 ± 0.04 ^{Cy}	6.61 ± 0.49 ^{ABx}
5.	7.47 ± 0.56 ^{Ax}	6.87 ± 0.77 ^{Ax}	5.41 ± 0.16 ^{BCx}	5.80 ± 0.10 ^{Bx}	6.84 ± 0.49 ^{Ax}	4.29 ± 0.17 ^{Cy}	4.81 ± 0.13 ^{Cy}	6.99 ± 0.65 ^{Ax}
7.	6.94 ± 0.09 ^{Ax}	6.56 ± 0.18 ^{ABx}	5.41 ± 0.09 ^{Bx}	5.66 ± 0.15 ^{Bx}	6.42 ± 0.09 ^{ABx}	4.17 ± 0.04 ^{Cy}	4.86 ± 0.06 ^{BCy}	7.03 ± 0.49 ^{Ax}

ABC; means in the same line with different superscripts are statistically different (P < 0.05).

xy ; means in the same column with different superscripts are statistically different (P < 0.05).

1st group: Control Group (No ASC or sauce application), 2nd group: Sauce without any ASC content was applied, 3rd group: Kept for 2 minutes in solution containing 1200 ppm ASC, 4th group: Kept for 2 minutes in solution containing 1200 ppm ASC and then sauce was applied, 5th group: Sauce with 1200 ppm ASC content was applied, 6th group: kept for 2 minutes in solution containing 1800 ppm ASC content, 7th group: kept for 2 minutes in solution containing 1800 ppm ASC and then sauce was applied, 8th group: Sauce with 1800 ppm ASC content was applied.

Table 2. pH values of the groups during storage at 4 °C (n = 120).

Storage days	GROUPS							
	1 st group	2 nd group	3 rd group	4 th group	5 th group	6 th group	7 th group	8 th group
0.	6.53 ± 0.06	5.73 ± 0.07	5.13 ± 0.06	5.17 ± 0.07	5.25 ± 0.07	5.07 ± 0.06	5.14 ± 0.04	5.21 ± 0.03
2.	6.74 ± 0.06	5.84 ± 0.06	5.19 ± 0.08	5.25 ± 0.07	5.31 ± 0.08	5.15 ± 0.05	5.26 ± 0.04	5.33 ± 0.07
3.	6.83 ± 0.06	5.93 ± 0.08	5.25 ± 0.07	5.34 ± 0.05	5.41 ± 0.04	5.23 ± 0.08	5.32 ± 0.03	5.37 ± 0.03
5.	6.92 ± 0.04	6.06 ± 0.06	5.35 ± 0.05	5.43 ± 0.03	5.53 ± 0.06	5.25 ± 0.06	5.34 ± 0.06	5.41 ± 0.07
7.	6.97 ± 0.03	6.15 ± 0.08	5.46 ± 0.06	5.55 ± 0.07	5.64 ± 0.07	5.36 ± 0.04	5.45 ± 0.05	5.54 ± 0.05

Sauce pH; 3.24, ASC pH; 2.38

DISCUSSION

This research was conducted in order to examine the effects of ASC solution and sauce containing ASC on *L. monocytogenes* in keeping chicken chops contaminated with that pathogen at 4 °C. Del Rio et al. (2007), stated that an important residual effect was observed in number of *L. monocytogenes* and *Salmonella* when keeping drumsticks, which were held in solution containing 1200 ppm ASC for 15 minutes, in storage for 0, 1, 3, and 5 days. In this study, it was determined that ASC solution in groups 6 and 7 provides antibacterial effect on *L. monocytogenes*.

During our research, the antimicrobial effect on number of *L. monocytogenes* increased (0.10 - 1.85 log₁₀cfu/g) in parallel with storage duration with usage of solutions containing 1200 ppm and 1800 ppm ASC. The highest reduction was found to be between control group and groups immersed into ASC solutions on day 7 in group 6 with 2.77 log₁₀cfu/g reduction. Similarly, 2.86 log₁₀cfu/g of reduction was found between in group 8 to which sauce containing 1800 ppm ASC and in group 6 immersed into ASC solution the end of storage duration. These results showed similarities with those reported by Del Rio et al. (2007), Lim and Mustapha (2004), and Özdemir et al. (2005).

No study about the combinations of sauces and ASC solutions were found during conducted literature researches. In addition, sauces prepared by soy has been used. Moon and Rhee (2016), reported that thymol and carvacrol added soy sauce has considerably decreased the number of *L. monocytogenes*. Burt (2004) reported that

Gram (+) bacteriae are more sensitive to carvacrol and thymole. In the present sauce, the sauced groups thyme has no effects on *L. monocytogenes*. In group 4 where sauce was applied after sinking in solution containing 1200 ppm ASC, 1.28 log₁₀cfu/g decrease in number of *L. monocytogenes* in proportion to control group was found at the end of day 7. Similarly, in group 5 where sauce containing 1200 ppm ASC was applied, 0.52 log₁₀cfu/g decrease in number of *L. monocytogenes* in proportion to control group was found at the end of day 7. However, in group 7 where sauce was applied after sinking in solution containing 1800 ppm ASC, 2.08 log₁₀cfu/g decrease in number of *L. monocytogenes* in proportion to control group was found at the end of day 7. Differently, in group 8 the sauce containing 1800 ppm ASC, the number of *L. monocytogenes* on day 7 has increased at a level of 0.57 log₁₀cfu/g compared to day 0. The lower antibacterial effects of implementation of sauce containing ASC can be attributed to that the materials used in sauce mixture acted as barrier by cohering on surfaces of samples, or that they conjoined with materials in sauce combination, or that they reacted with materials in sauce combination. The highest antimicrobial effect among groups was determined in samples kept at 4 °C after sinking in solution containing 1800 ppm ASC.

In groups where only sauce was applied, the obtained results were similar with those in control group. The used sauce composition had no antimicrobial effect on *L. monocytogenes*. We believe that its reason is that the concentrations used in sauce composition were not enough in order to create antimicrobial effect. Zarai et al. (2013), reported that black pepper (due to containing of

piperine and piperic acid) is efficient on Gram (-) bacteria more than Gram (+) bacteria. Ting and Deibel (1992), reported that black pepper, garlic and red pepper have no antimicrobial effect on reproduction of *L. monocytogenes* up to 3% concentration. The carvacrol and thymol contained by thyme has the effect of elimination of *L. monocytogenes* and other pathogens when added in soy sauce (Moon and Rhee 2016). Garlic has thiosulphinate compounds which have antimicrobial effects (Rhoades et al. 2013). In the present study, the effects of thyme, garlic and black pepper could not be determined on *L. monocytogenes* in regard to dose and the amount.

The increases in pH value depending on storage duration in this study can be attributed to increase in microbial reproduction. Koutsoumanis et al. (2004) reported that the proliferation of *L. monocytogenes* needs pH 5.1 at 15 °C. As there is inclination to increase in pH during storage, no negative effects on *L. monocytogenes* were determined. In the present study, the groups (6 and 7) which was directly added 1800 ppm ASC had the lowest pH levels. The samples that kept in low temperature inhibited *L. monocytogenes* by increasing ASC concentration.

CONCLUSION

According to results obtained in this study, it was determined that the implementations showed antimicrobial effect on *L. monocytogenes* in some groups. This effect is ranged as immersing in ASC solution, sauced up after immersing in ASC solution and implementation of sauce containing ASC. During this study, the solution containing 1800 ppm ASC (immersion method) created the highest effect on *L. monocytogenes*. It was revealed that the effective methods can be used for eliminating the bacterial risks arising from broiler meats. It is thought that better effects can be obtained by changing the rates of spices.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Firat University Scientific Research Project Fund (FUBAP - 1865).

REFERENCES

- Ahmed OM, Pangloli P, Hwang C, Zivanovic S, Wu T, D'Souza D, Draughon FA (2015). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in retail ready-to-eat meat and poultry products related to the levels of acetate and lactate in the products. *Food Cont*, 52, 43-48.
- Arslan A (2002). Inspection of Meat and Meat Products Technology. Medipres, Malatya. Turkey. 1, 449-451.
- Border P, Howard JJ, Plastow GS, Siggins KW(1990). Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, 11, 158-162.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*, 94, 223-253.
- Del Río E, Muriente R, Prieto M, Alonso-Calleja C, Capita R (2007). Effectiveness of trisodium phosphate, acidified sodium chlorite, citric acid, and peroxyacids against pathogenic bacteria on poultry during refrigerated storage. *J Food Protect*, 70, 2063-2071.

- Hwang CA, Beuchat LR (1995). Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J Food Protect*, 58, 19-23.
- Kim SA, Rhee MS (2013). Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 79, 6552-6560.
- Koutsoumanis KP, Kendall PA, Sofos JN (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol*, 21, 415-422.
- Leong D, Alvarez-Ordóñez A, Jordan K (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Front Microbiol*, 5, Article:436, 1-8. doi:10.3389/fmicb.2014.00436.
- Lim K, Mustapha A (2004). Effects of cetylpyridinium chloride, acidified sodium chlorite, and potassium sorbate on populations of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on fresh beef. *J Food Protect*, 67, 310-315.
- Martin B, Perich A, Gomez D, Yangüela J, Rodríguez A, Garriga M, Aymerich T (2014). Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiol*, 44, 119-127.
- Mead GC (2004a). Microbiological quality of poultry meat: a review. *Braz J Poult Sci*, 6, 135-142.
- Mead GC (2004b). Shelf-life and Spoilage of Poultry Meat, In: Mead GC, Editor. Poultry Meat Processing and Quality. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK
- Moon H, Rhee MS (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *Int J Food Microbiol*, 217, 35-41.
- Özdemir H, Koluman A, Yıldırım Y (2005). Effects of acidified sodium chlorite, cetylpyridinium chloride and hot water on populations of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on beef. *Lett Appl Microbiol*, 43, 168-173.
- Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS (2012). American Academy of Pediatrics. *Listeria monocytogenes* Infections (listeriosis). In; editors. Red Book: 29th Edition 2012 report of the Committee of Infectious Diseases. Elk Grove Village (IL 60007-1098): American Academy of Pediatrics, 471-474
- Rhoades J, Kargiotou C, Katsanidis E, Koutsoumanis KP (2013). Use of marination for controlling *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Food Microbiol*, 36, 248-253.
- Rodríguez-de-Ledesma AM, Riemann HP, Farver TB (1996). Short-time treatment with alkali and/or hot water to remove common pathogenic and spoilage bacteria from chicken wing skin. *J Food Protect*, 59, 746-750.
- Ting WTE, Deibel KE (1992). Sensitivity of *L. monocytogenes* to spices at two temperatures. *J Food Safety*, 12, 129-137.
- United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service-Office of Public Health and Science (2002). Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry and environmental samples. Rev:03.
- USFDA (1998). Federal Register. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Food and Drug Administration. *Fed Reg*, 63, 11118-11119.
- Yang S, Pei X, Wang G, Yan L, Hu J, Li Y, Li N, Yang D (2016). Prevalence of food-borne pathogens in ready-to-eat meat products in seven different Chinese regions. *Food Cont*, 65, 92-98.
- Zarai Z, Boujelbene E, Salem NB, Gargouri Y, Sayari A (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT-Food Sci Technol*, 50, 634-641.



Detection of Some Bacteriocin Genes in *Enterococcus faecium* Isolates Obtained from Mastitic Bovine Milk Samples

Yeter DELİBAŞ¹ Süheyla TÜRKYILMAZ²

¹ Adnan Menderes University, Health Science Institute, Department of Veterinary Microbiology, Aydın, Turkey

² Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey

Received: 13.04.2017

Accepted: 22.11.2017

SUMMARY

In this study, *Enterococcus faecium* isolates obtained from mastitis cattle were investigated for carrying the most important bacteriocin structural genes enterocin A (entA), enterocin B (entB), enterocin P (entP) genes. The study material was 620 milk samples taken from mastitic cattle. Enterococcal isolation was performed using classical bacteriological methods in selective media. Molecular methods were used to in order to conduct the identification of genus and species as well as the presence of enterocin genes. As a result of isolation studies, 15.5% (96 isolates) of enterococci were isolated; of which 13.5% (13 isolates) were *E. faecium*. entA and entB genes bacteriocin structural genes were determined to be 30.8% (4 isolates) and the entP gene 7.7% (1 isolate). There were two gene combinations: the first one with 23.0% (3 isolates) entA + entB gene combination and the second with 7.7% (1 isolate) entA + entB + entP genes. This study showed that *E. faecium* strains obtained from mastitic cattle milk could potentially synthesize bacteriocin because they have potency to carry bacteriocin genes. It is believed that further studies are needed to determine the distribution of bacteriocin genes in other enterococci isolated from bovine milk of mastitis and to search for potential use of bacteriocins in this area.

Key Words: *Enterococcus faecium*, Bovine, Mastitis, Bacteriocin, Gene

ÖZET

Mastitisli Sığır Süt Örneklerinden Elde Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında Bazı Bakteriyosin Genlerinin Saptanması*

Bu çalışmada mastitisli sığırlardan elde edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının, en önemli bakteriyosin yapısal genleri olan enterosin A (entA), enterosin B (entB), enterosin P (entP) genlerini taşıma potansiyelleri araştırıldı. Çalışma materyalini 620 mastitisli sığırdan alınan süt örnekleri oluşturdu. Enterokok izolasyonu selektif besiyerinde klasik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Cins ve tür düzeyinde identifikasyon ile bakteriyosin gen varlıklarını belirlemek için moleküler yöntemler kullanıldı. İzolasyon çalışmaları sonucunda %15.5 (96 izolat) enterokok izole edilirken; bunların %13.5 (13 izolat)'unun *E. faecium* olduğu belirlendi. Bakteriyosin yapısal genlerinden entA ve entB genleri izolatların %30.8 (4 izolat)'inde belirlenirken; entP geni %7.7 (1 izolatta) bulunuyordu. İki gen kombinasyonu mevcuttu: Bunlardan birincisi %23.0 (3 izolat) oranında entA+entB gen kombinasyonu ikincisi ise %7.7 (1 izolat) oranında entA+entB+entP genlerinin birlikte görüldüğü kombinasyondur. Bu çalışma ile mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *E. faecium* suşlarının bakteriyosin genlerini taşıma potansiyeline sahip oldukları dolayısı ile bakteriyosin sentezleyebilecekleri belirlendi. Mastitis sığır sütünden izole edilen diğer enterokoklarda bakteriyosin genlerinin dağılımını saptamak ve bakteriyosinlerin bu alanda kullanım potansiyelini aramak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulduğuna inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecium*, Sığır, Mastitis, Bakteriyosin, Gen

GİRİŞ

Bakteriyosinler bazı bakteriler tarafından sentezlenen küçük, ısıya dayanıklı peptidlerdir. Diğer bakterilere karşı etkilidirler ve üretici bakteri kendi bakteriyosinine karşı spesifik bağışıklık mekanizmasına sahiptir. Bakteriyosinlerin, birçok bakteri tarafından sentezlendiği

düşünülmemektedir. Bakteriyosinler bakteriyosin üretmeyen diğer bakterilerin protein sentez mekanizmasını bozarak bunların ölümüne neden olmakta veya gelişimlerini engellemektedirler. Bunu yaparken muhtemelen bakteriyosin üretmeyen mikroorganizmalar üzerinde rekabet açısından bir üstünlük sağlayarak hayatta kalma şanslarını artırmaktadırlar (Franz ve ark. 2007).

Antibiyotiklere karşı dirençli suş oluşumu çok sık görülmesine rağmen, bakteriyosinlere karşı dirençli suş gelişimi oldukça nadirdir. Toksik değildir; renksiz, tatsız, kokusuzdur. Bakteriyosinler, veterinerlik ve tıp alanlarında doğal antibiyotik ve hastalıkları tedavi edici olarak kullanılırken gıda sektöründe de biyokoruyucu özelliğinden dolayı tercih edilmektedir (Foulque Moreno ve ark. 2006).

Bakteriyosin üreten suşların, aynı ekosistemde yaşayan bakteriyosin üretmeyen diğer bakteriler üzerine ekolojik üstünlüğü bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinden olan enterokoklar, üretici mikroorganizma ile yakından ilgili suşlara karşı inhibitör etkinliği olan enterosinler olarak isimlendirilen bakteriyosinler (antimikrobiyal peptidler) üretebilir (Nes ve ark. 2007).

Enterokoklar tarafından üretilen pek çok bakteriyosin bulunmakla birlikte; bunlardan en önemlileri enterosin A, enterosin B ve enterosin P'dir (Franz ve ark. 2007). entA, entB ve entP sırası ile bu bakteriyosinlerin yapısal genleridir. Bir enterokokta bakteriyosin yapısal genlerinin saptanması her zaman enterosin üretimi anlamına gelmez (Strompfova ve ark. 2008) ama bakteriyosin üretme potansiyeli olan izolatların pratik anlamda belirlenmesi açısından önemli olabilir. Pekçok araştırmacı enterosin yapısal geninin bulunmasının, ilgili enterosinin üretimi anlamına gelmediğini ve sessiz bakteriyosin genlerinin varlığını bildirilmişlerdir (Eaton ve Gasson 2001; Semedo ve ark. 2003; Poeta ve ark. 2007). Nes ve ark. (2007); bakteriyosin genlerinin belirlenmesinin ilgili bakterinin mutlaka antibakteriyel aktiviteye sahip olması gerektiğini ve saptanabilir antibakteriyel aktivitenin olmamasının da bakteriyosin üretimi olmadığı anlamına gelmediğini bildirilmiştir. Bunun nedeni, ilk olarak, bazı peptid bakteriyosinler hedef bakteri üzerine dar spektrumda etkili olabilir, bu da duyarlı bir indikatör kullanımı için anahtar bir öneme sahiptir. İkinci, peptid bakteriyosin üretiminin sıklıkla düzenlenmesidir. Antibakteriyel aktivite üretiminin yetersizliği genellikle fonksiyonel olmayan bir genetik sistemle ilişkilidir (Nes ve ark. 2007).

Gıda, yem, hayvan izolatları, klinik ve klinik olmayan insan izolatlarının ürettiği enterosinlerin incelendiği yayınlar (Du Toit ve ark. 2000; Del Campo ve ark. 2001; De Vuyst ve ark. 2003; Hugas ve ark. 2003) mevcut olmakla birlikte, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının bakteriyosin oluşturma kapasitelerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Kim ve

ark. 2008). Bu çalışmada da, bakteriyosin oluşturma potansiyellerinin incelenmesi amacı ile mastitisli sığır sütlerinden elde edilen toplam 30 izolat (*Aerococcus viridans*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus simulans*) 72 indikatör bakteri ile yumuşak agar yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Çalışma sonucunda, Kore'de subklinik mastitise neden olan baskın patojenlerden olan koagülaz negatif stafilkok (CNS) türleri de dahil olmak üzere indikatör suşlar üzerine *L. lactis*'in belirgin bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da, yöremizde mastitisli sığır sütlerinden izole enterokok türleri içerisinde halk sağlığı açısından önemli bir tür olan *Enterococcus faecium* sıklığını belirlenmesi, bu izolatlarda en önemli bakteriyosin yapısal genlerinden olan entA, entB, entP genlerini taşıma potansiyellerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmada materyal olarak, rutin teşhis amacı ile getirilmiş olan ve son iki yıl içerisinde saha çalışmaları esnasında toparlanan, hepsi laktasyon döneminde, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, 3-9 yaşları arasında, Holştayn ırkı ineklerden, veteriner hekim tarafından alınmış 620 klinik veya subklinik mastitisli süt örneği kullanıldı. Klinik mastitisli ineklerde fiziksel muayenede meme loblarında anormallik (şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) gözlemlenirken; subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) kullanıldı.

Besiyerleri

Süt örneklerinden selektif olarak enterokok türlerinin izolasyonu amacıyla Chromocult® Enterococci Broth (EB) (Merck) ve BBL™ Enterococcosel Agar (EA) (BD), organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid) ve izolatların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

Primerler

Çalışmada kullanılan primerlerin sekansları, ampikon uzulukları, hedef genleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan primerler dizileri, ampikon uzunlukları, hedef genleri

Table 1. Sequences, amplicon lengths, target genes of used primers

Primer	Sekans (5'-3')	Ampikon uzunluğu (bp)	Hedef Gen	Kaynak
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	<i>tuf</i>	Ke ve ark 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
FAC11	GAGTAAATCACTGAACGA	1.091	<i>ddl E.faecium</i>	Vilela ve ark 2006
FAC21	CGCTGATGGTATCGATTTCAT			
entP	GCTACGCGTTTCATATGGTAAT TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	Enterocin P	Cintas ve ark 1997
entA	GGTACCACTCATAGTGGAAA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	Enterocin A	De Vuyst ve ark 2003
entB	CAAAATGTAAGAATTAAGTACG AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	Enterocin B	De Vuyst ve ark 2003

Metot

Enterokok İzolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra, EB'a bir öze dolusu inokule edildiler. Buyyonlar aerob koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşüncüye kadar, yaklaşık 24-72 saat inkübe edildi. Daha sonra renk değişimi olan kültürlerden selektif EA'a ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerob koşullarda 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda üreyen siyah, koyu kahverengi koloniler enterokok türleri yönünden şüpheli kabul edilerek incelenmek üzere tekrar EA'a pasajlandı.

Enterococcus spp. ve E. faecium İdentifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah, koyu kahverengi üreyen enterokok şüpheli kolonilere Gram boyama, %6.5 tuz içeren NB'da üreme ve katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010). Gram pozitif kok şeklinde görülen, %6.5 tuz içeren, NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda şüpheli koloniler PZR ile incelenene kadar -20°C'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı.

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, BIO-RAD, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. DNA saflık kontrolü ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra PZR'da kullanıldı.

PZR

Çalışmada enterokokları cins düzeyinde identifikasyonu için *tuf* geni (Ke ve ark. 1999), bu enterokoklar içerisinde *E. faecium*'un tür düzeyinde identifikasyonu için *ddl_{E.faecium}* geni (Vilela ve ark. 2006) daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi PZR ile yapıldı. Çalışmada sikluslar 95 °C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu takiben; 95 °C'de 30 sn. denatürasyon, 52 °C (entP), 53 °C (*E. faecium*), 54 °C (entB), 55 °C (*Enterococcus* sp., entA) bağlanma, 72 °C 60 sn. uzama toplam 30 döngü, 72 °C'de 15 dak. son uzama olacak şekilde ayarlandı.

BULGULAR

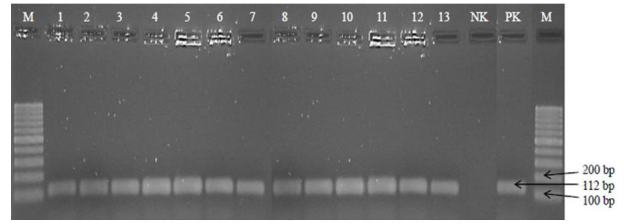
İzolasyon

Bu çalışmada 620 klinik/subklinik mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda toplamda %15.5 (96 izolat) oranında enterokok şüpheli izolat elde edildi.

PZR

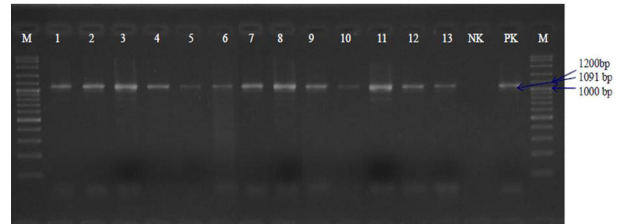
Doksan altı enterokok şüpheli izolat ile yapılan PZR sonrasında 96 izolatın hepsinde 112 bp uzunluğunda amplicon elde edildi ve *Enterococcus* spp. olarak tanımlandı (Şekil 1).

Enterococcus spp. olarak tanımlanan 96 izolat DNA'sı ile yapılan PZR sonrasında, izolatların 13 (%13.5)'ünde 1091 bp uzunluğunda amplicon elde edildi ve bunlar *E. faecium* olarak identifiye edildi (Şekil 2).



Şekil 1. *Enterococcus* sp.'nin *tuf* geninin PZR ile saptanması **1-13:** *Enterococcus* sp. saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212, 112 bp) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

Figure 1. The PCR assay of *tuf* gene for the detection of *Enterococcus* sp. **1-13:** *Enterococcus* sp. field isolates **PK:** Positive control for *tuf* gene (*E. faecalis* ATCC 29212, 112 bp), **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 35150) **M:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Vivantis)

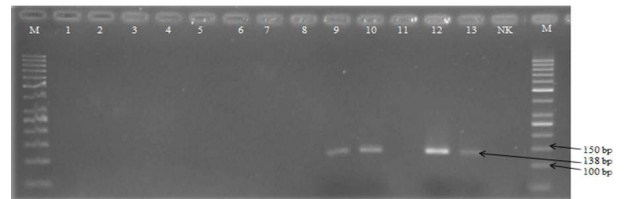


Şekil 2. *E. faecium*'nin *ddl_{E.faecium}* geninin PZR ile saptanması belirlenmesi **1-13:** *E. faecium* saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (sekanslanmış saha izolatı, 1091 bp) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (100 bp DNA ladder, Vivantis)

Figure 2. The PCR assay of *ddl_{E.faecium}* gene for the detection of *E. faecium* **1-13:** *E. faecium* field isolates **PK:** Positive control for *ddl_{E.faecium}* gene (Sequenced field isolate, 1091 bp), **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 35150) **M:** Marker (100 bp DNA Ladder, Vivantis)

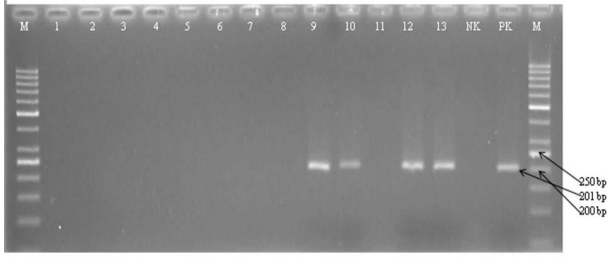
Bakteriyosin Genleri (entA, entB, entP):

On üç *E. faecium* izolatının bakteriyosin genleri yönünden yapılan PZR incelemesi sonucunda izolatların %30.8 (4 izolat)'inin entA geni, %30.8 (4 izolat)'inin entB geni, %7.7 (1 izolat)'inin entP geni pozitif olduğu belirlendi (Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5).



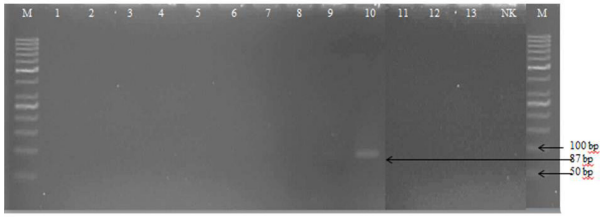
Şekil 3. entA geninin elektroforez görünümü **9,10,12,13.** entA pozitif izolatlar (138 bp) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

Figure 3. Electrophoresis image of entA gene **9,10,12,13.** entA positive isolates (138 bp) **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)



Şekil 4. entB geninin elektroforez görünümü **9,10,12,13.** entB pozitif izolatlar (201 bp) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

Figure 4. Electrophoresis image of entB gene **9,10,12,13.** entB positive isolates (201 bp) **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)



Şekil 5. entP geninin elektroforez görünümü **10.** entP pozitif izolatlar (87 bp) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

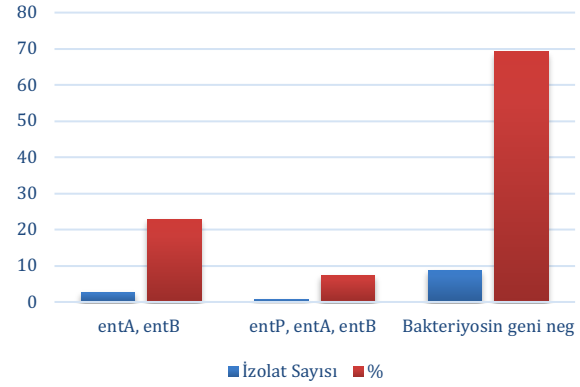
Figure 5. Electrophoresis image of entP gene **10.** entP positive isolates (87 bp) **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

Tablo 2. *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin genleri

Table 2. Bacteriocin genes carried by *E. faecium* isolates

	entP	entA	entB	Bakteriyosin gen kombinasyonları
1	-	-	-	
2	-	-	-	
3	-	-	-	
4	-	-	-	
5	-	-	-	
6	-	-	-	
7	-	-	-	
8	-	-	-	
9	-	+	+	entA, entB
10	+	+	+	entP, entA, entB
11	-	-	-	
12	-	+	+	entA, entB
13	-	+	+	entA, entB
Toplam	1	4	4	
(%)	(7.7)	(30.8)	(30.8)	

Sonuçlar bakteriyosin yapısal gen kombinasyonları yönünden değerlendirildiğinde ise iki gen kombinasyonu mevcuttu: Bunlardan birincisi %23.0 (3 izolat) oranında entA+entB gen kombinasyonu ikincisi ise %7.7 (1 izolat) oranında entA+entB+entP genlerinin birlikte görüldüğü kombinasyondur (Tablo 2, Şekil 6).



Şekil 6. *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin gen kombinasyonları

Figure 6. Bacteriocin gene combinations carried by *E. faecium* isolates

TARTIŞMA ve SONUÇ

Enterokok cinsi bakteriler üzerine olan ilgi son yıllarda, bu bakterilerin önemli nazokomial patojenler olarak kabul edilmeleri ile birlikte, transfer edilebilir veya kazanılabilir çoklu antibiyotik dirençliliklerinin bulunması nedeni ile artmıştır (Eaton ve Gasson 2001). Enterokok cinsi bakteriler insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yaşayan saprofit bakterilerdirler bu karmaşık ekosistemde hayatta kalmak için ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet etmek zorundadırlar (Lorenzelli 1994; Turtura ve Giraffa 1995).

Bakteriyosin üreten suşların, aynı ekosistemde yaşayan bakteriyosin üretmeyen diğer bakteriler üzerine ekolojik üstünlüğü bulunmaktadır. Farklı orjinlerden izole edilen enterokok suşlarının ürettiği enterosinlerin incelendiği yayınlar bulunmaktadır (De Vuyst ve ark. 2003; Hugas ve ark. 2003). Bakteriyosin üreten enterokokların önemli bir kısmı gıdalardan (peynir, et, balık, sebze) insanlar ve hayvanlardan (Foulquie ve ark. 2006; Brandão ve ark. 2010) izole edilmektedir. Bakteriyosin üreten enterokoklar aynı zamanda çöplerden (Laukova ve Jurin 1997), atık sularından (Marekova ve ark. 2007), farklı ruminantların rumen içerikleri ve hayvansal atıklardan (Laukova ve Marekova 2001) izole edilmiştir. Bununla birlikte hayvansal kaynaklardan izole edilmiş olan enterokok izolatlarının incelendiği çalışmalar sınırlı olmakla birlikte (Du Toit ve ark. 2000; Del Campo ve ark. 2001; De Vuyst ve ark. 2003), mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının bakteriyosin oluşturma kapasitelerinin incelendiği tek bir çalışmaya rastlanılmıştır (Kim ve ark. 2008). Bu çalışmada da, enterokokların yalnızca fenotipik olarak bakteriyosin oluşturabilme kapasiteleri belirlenmiş olup gen taşıma potansiyelleri incelenmemiştir.

Sınıf II bakteriyosinler 3 grupta incelenir. Birinci grupta pediosin ailesinin enterosinleri olan enterosin A ve enterosin P bulunur. İkinci grupta, lider peptid olmaksızın sentezlenen bakteriyosinlerden olan enterosin L50A/B, üçüncü grupta ise yine biyokimyasal yapıları daha farklı lineer pediosin olmayan enterosinlerden olan enterosin B yer almaktadır (Nilsen ve ark. 2003). Farklı orjinlerden izole edilmiş olan *E. faecium* suşlarında tekli ve çoklu enterosin yapısal genlerinin varlığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Poeta ve ark. 2006; Poeta ve ark. 2007; Özdemir ve ark. 2011). Yapılan bu çalışmalar genellikle dışkı, çevresel örnekler ve gıdalardan izole edilen

enterokok suşları üzerine odaklanmıştır. Yapılan bir çalışmada kümes hayvanlarının dışkı örneklerinden 76 enterokok (43 *E. faecalis*, 30 *E. faecium*, 2 *E. durans*, 1 *E. hirae*) izole edilmiş ve bu enterokoklarda bakteriyosin gen varlığı PZR ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda entA ve entB genleri 9 *E. faecium* izolatında belirlenmiştir (Poeta ve ark. 2006). Başka bir çalışmada, entA 15 *E. faecium* suşunda tespit edilmekle birlikte bunlardan 12 tanesinde entB geninin de bulunduğu bildirilmiştir (Poeta ve ark. 2007). Aynı çalışmada, entA, entB, ve entP gen kombinasyonu yarıcık bir kuş ve bir tilkiden elde edilmiş olan 2 *E. faecium* izolatında saptanmıştır (Poeta ve ark. 2007). Başka bir çalışmada ise, çevresel örneklerden izole edilen 57 enterokok (34 *E. faecium*, 6 *E. hirae*, 4 *E. casseliflavus*, 4 *E. durans*, 4 *E. faecalis*, 3 *E. mundtii* ve 2 *E. avium*) izole edilmiş; bunlardan 34 *E. faecium* izolatlarının 22'sinin entA, entB, entP; 9'unun entA, entB, birinin entA ve entP yapısal genlerini taşıdığını bildirilirken 2 izolatın herhangi bir yapısal gen taşımadığı belirlenmiştir (Özdemir ve ark. 2011)

Yapılan çalışmalarda bakteriyosin üreten enterokok izolatlarının yüksek gen taşıma potansiyellerinin olduğu bildirilmektedir (Casaus ve ark. 1997; Cintas ve ark. 2000; Poeta ve ark. 2007). Bazı çalışmalarda fermente gıdalardan izole edilmiş enterokoklarda birden fazla bakteriyosin kodlayan genin PZR ile saptanmasının çok sık görülmeye başladığı bildirilmekle birlikte (Edalatian ve ark. 2012), Özden Tuncer ve ark. (2013) peynirden izole ettikleri 3 *E. faecium* suşunun birinin entA ve entB, ikisinin ise entA, entB ve entP taşıdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde 3 farklı genin 2 farklı kombinasyonuna rastlanılmıştır. Bunlar %23.0 oranında (3 izolat) entA+entB ve %7.7 oranında (1 izolat) entA+entB+entP genlerinin birlikte görüldüğü gen kombinasyonlarıydı. Yapılan pek çok çalışmada da benzer gen kombinasyonları bildirilmektedir (Poeta ve ark. 2006; Poeta ve ark. 2007; Brandão ve ark. 2010; Özdemir ve ark. 2011). Enterokoklar arasında genetik materyalin suşlar arasında aktarılması, sık görülen enterosin genlerinin dağılımını sağlamış olabilir (Strompfova ve ark. 2008).

Kanatlı hayvan ve domuz üretiminde bakteriyosinler ve bakteriyosin üreten bakterilerin potansiyel avantajlarından yararlanılmaktadır. Saflaştırılmış veya yarı saflaştırılmış bakteriyosinler hayvanları korumak için hayvan yemine katkı maddeleri olarak doğrudan ilave edilebilir. Alternatif olarak, bakteriyosin üreten bakteriler, probiyotikler olarak kullanılabilir ve bakteriyel patojenlere karşı kolonizasyon ve koruma sağlamak için hayvanlara inoküle edilebilir. Her iki prosedür de gıda kaynaklı patojenler kadar hayvan patojenlerini de azaltabilir. Sonuç olarak, bu, antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını, ekonomik kayıpları ve insan sağlığına olumsuz etkileri azaltabilir. Birçok ülke antibiyotik kısıtlayıcı politikalar geliştirdiğinde, alternatif antimikrobiallere duyulan ihtiyaç yeni bakteriyosinlerin belirlenmesinde ve mevcut bakterilerin test edilmesinde temel itici güç olacaktır (Ben Lagha ve ark. 2017).

Hayvan üretiminde yarı saflaştırılmış bakteriyosinler veya bakteriyosin üreten bakterilerin kullanılması muazzam bir araştırma ve pazarlama potansiyeli olan bir alandır. Bakteriyosinler, bakteriyel hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilir (Ben Lagha ve ark. 2017). Bakteriyosinler, sadece antimikrobiyal büyüme promotörlerine alternatif değil, aynı zamanda hayvan hastalıklarının önlenmesi, kontrolü ve tedavileri için umut verici terapötik ajanlar olarak da düşünülmektedir. Birkaç çalışma, efektif antimikrobiyal terapötikler veya profilaktik olarak saflaştırılmış

bakteriyosin potansiyelini araştırmış ve umut verici sonuçlar vermiştir (Ogunbanwo ve ark. 2004, Cole ve ark. 2006). Bununla birlikte, her bir bakteriyosinin üretim maliyeti, dozajı, zamanlaması ve in vivo aktivitesi de dahil olmak üzere ele alınması gereken bir takım hususlar halen devam etmektedir. Yapılan ilginç bir çalışmada, balıklardan bakteriyosin üreten *Bacillus* türleri izole edilmiş ve bu bakteriyosinlerin, sığır mastitis patojenlerine karşı antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilir potansiyelleri incelenmiş bu *Bacillus* izolatlarının, sığır mastitis patojenlerinin önlenmesi için arzu edilen özelliklere sahip olduğu ve potansiyel bir uygulama ile cazip aday olabileceği bildirilmiştir (Wanjiru Maina 2015).

Bakteriyosinler atık sularda ve gübrede bulunan patojenik bakterin insanlara bulaşmasını sınırlandırmak için de kullanılabilir (Lauková ve ark. 2000). Bu uygulamalar kümes hayvanları ve domuz sanayilerine aktarılabilir ancak bu olasılığı doğrulamak için daha fazla araştırma gerekmektedir (Ben Lagha ve ark. 2017).

Sonuç olarak, bu çalışma yörenizde mastitisli sığır sütlerinden elde edilen enterokoklar içerisinde, halk sağlığı açısından oldukça önemli bir tür olan, *E. faecium* izolasyon oranının düşük olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, *E. faecium* izolatları enterosin yapısal genlerini taşıma dolayısı ile bakteriyosin oluşturabilme potansiyeline sahip idi. Enterosin genlerinden entA, entB ve entP genleri, genellikle farklı kombinasyonlarda birlikte taşınıyordu. Bu şekilde birden çok enterosin genini içeren dört *E. faecium* izolatının çeşitli enterosinleri üretebilen genetik potansiyelleri yüksek izolatlar oldukları düşünülebilir. Enterokoklarda bakteriyosin yapısal genlerinin farklı kombinasyonlarının yaygın görülmesi onların biyoteknolojik uygulamalarda, gıda veya ilaç endüstrisinde ya da insan ya da hayvan sağlığında probiyotik olarak kullanımları için uygun olabilir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından VTF-15071 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res* 48:22. DOI 10.1186/s13567-017-0425-6
- Brandão A, Almeida T, Muñoz-Atienza E, Torres C, Igrejas G, Hernández PE, Cintas LM, Poeta P, Herranz C (2010). Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch Microbiol*, 192, 927-936.
- Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes, IF, Hernández PE, Holo H (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin. *Microbiol-SGM*, 143, 2287-2294.
- Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernandez PE, Nes IF (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol*, 63, 4321-4330.
- Cole K, Farnell MB, Donoghue AM, Stern NJ et al., (2006). Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult Sci* 85:1570-1575.
- De Vuyst L, Foulquie Moreno MR, Revets H (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol*, 84, 299-318.
- Del Campo R, Tenorio C, Jimenez-Diaz R, Rubio C, Gomez-Lus R, Baquero F, Torres C (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Ch*, 45, 905-912.
- Du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Holzapfel WH (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl Microbiol*, 88, 482-494.

- Eaton TJ, Gasson MJ (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1628–1635.
- Edalatian MR, Najafi MBH, Mortazavi SA (2012). Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Tech Z Lebensm Unters Forsch*, 234, 789–796.
- Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, DeVuyst L (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106, 1–24.
- Franz CM, Worobo RW, Quadri LEN, Schillinger U, Holzapfel WH, Vederas JC, Stiles ME (1999). A typical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl Environ Microbiol*, 65, 2170–2178.
- Franz CMAP, Van Belkum M, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 293–310.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich MT (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol*, 88, 223–233.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*, 37, 3497–3503.
- Kim SY, Park YK, Kim SH, Shin S, Koo HC, Youn JH, So JH, Paik HD, Park YH, Choi KY (2008). Isolation of bacteriocin producing bacteria from bovine milk effective to bovine mastitis-causing and other antibiotic-resistant bacteria. *The Congress of FAVA, FAVA - OIE Joint Symposium on Emerging Diseases*, 27-30 October, Bangkok, Thailand.
- Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E (2010). Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Can J Microbiol*, 56, 715–29.
- Laukova A, Jurin P (1997). Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. *Microbios*, 97, 73–80.
- Laukova A, Marekova M (2001). Production of bacteriocins by different enterococcal isolates. *Folia Microbiologica*, 46, 49–52.
- Lorenzelli P (1994). Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiol Res*, 149, 203–213.
- Marekova M, Laukova A, Skaugen M, Nes I (2007). Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. *J Ind Microbiol Biot*, 34, 533–7.
- Nes IF, Diep DB, Holo H (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol*, 189, 1189–98.
- Nilsen T, Nes IF, Holo H (2003). Enterolysin A, a cell Wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol*, 69, 2975–2984.
- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA (2004). Influence of bacteriocin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens in Nigeria. *World J Microbiol Biotechnol* 20, 51–56.
- Özdemir BG, Oryaşın E, Biyık HH, Özteber M, Bozdoğan B (2011). Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J Microbiol*, 51, 182–187.
- Özden Tuncer B, Ay Z, Tuncer Y (2013). Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turkish J Biol*, 37, 443–449.
- Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C (2006). Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis*, 50, 64–68.
- Poeta P, Costa D, Rojo-Bezarez B, Zarazaga M, Klibi N, Rodrigues J, Torres C (2007). Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol Res*, 162, 257–263.
- Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JFF, Tenreiro R, Crespo MTB (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, 41, 2569–2576.
- Strompřová V, Lauková A, Simonová M, Marcináková M (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet Microbiol*, 132, 293–301.
- Turtura GC, Giraffa G (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol*, 12, 291–299.
- Vilela MA, de Souza SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, de Morais Jr MA, da Costa Darini AL, de Morais MMC (2006). Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz*, 101, 716–719.
- Wanjiru MJ (2015). Isolation, identification and screening of *Bacillus* species from *Rastrineobola argentea* (Omena) for production of bacteriocins active against bovine mastitis pathogens (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). Jomo Kenyatta University, Food Science and Nutrition Master's Thesis.



The Use of Combination of Antibiotherapy and Dimethylsulphoxide in the Treatment of Infectious Keratoconjunctivitis in Calves

Semih ALTAN¹ Simten YEŞİLMEN ALP² Eylem BEKTAŞ BİLGİÇ¹

¹ Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Diyarbakır, Turkey

² Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Diyarbakır, Turkey

Received: 01.12.2017

Accepted: 27.02.2018

SUMMARY

Infectious keratoconjunctivitis in cattle is a contagious infectious eye disease that is mostly observed in the summer months and can cause vision loss if it is not treated in early stages. In the treatment of this disease; it is advised to be perform both parenteral and local administrations according to the progression of the disease. The purpose of this study is to compare efficiencies of a parenteral antibiotic combined with subconjunctival (SC) antibiotic and anti-inflammatory drug combination. In the study, IBK natural infected with 12 calves were used. Together with lacrimation, blepharospasm, photophobia; conjunctivitis at varying stages, corneal opacity, ulcer and perforation symptoms were determined in the animals. For bacterial agent analysis; in the swab samples were collected from the eyes of the animals, while *M. bovis* in 5 eyes, *S. Aureus* in 1 eye, both *M. bovis* and *E. coli* in 1 eye and both *E. coli* and *S. aureus* in 1 eye were isolated, any agent was not isolated in 3 eyes. After the single dose oxytetracycline LA (20 mg/kg IM) was administered, the animals were randomly divided into 2 treatment groups, each of which consisted of 6 eyes. While 40 % dimethylsulphoxide+penicillin G 800.000 IU mixture via SC was given to the group 1, dexamethasone+penicillin G 800.000 IU mixture via SC was given to the group 2. These administrations were repeated 4 times at 3-day intervals. At the end of the treatment, it was determined that except for the 2 cases, all the cases completely recovered. There were no differences between the two groups in terms of recovery time. As a consequence, dimethylsulphoxide could be used in the treatment combination with penicillin G as an alternative to dexamethasone in the IBK cases.

Key Words: Calf, Dimethylsulphoxide, IBK, *Moraxella bovis*, Treatment

ÖZET

Buzağlarda infeksiyöz keratokonjunktivitisin tedavisinde antibiyoterapi ve dimetilsülfoksit kombinasyonunun kullanılması

Sığırların infeksiyöz keratokonjunktivitis'i (IBK), çoğunlukla yaz aylarında gözlenen ve erken dönemde tedavi edilmediği takdirde gözlerde görme kaybına neden olabilen bulaşıcı karakterde enfeksiyöz bir göz hastalığıdır. Bu hastalığın tedavisinde hastalığın gidişatına göre parenteral ve lokal uygulamaların yapılması önerilmektedir. Bu çalışmada IBK tedavisinde parenteral bir antibiyotik ile subkonjunktival (SK) antibiyotik ve farklı iki antiinflamatuvar ilacın kombine uygulanması ile iyileştirici etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada doğal enfekte IBK'lı 12 buzağı kullanıldı. Hayvanlarda gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi ile birlikte değişik derecelerde konjunktivitis, korneal opasite, ülser ve perforasyon bulguları tespit edildi. Etken analizi için hayvanların gözlerinden alınan sürüntü örneklerinin 5'inde *M. bovis*, 1'inde *S. aureus*, 1'inde hem *M. bovis* hem de *E. coli*, 1'inde hem *M. bovis* hem de *S. aureus*, 1'inde hem *E. coli* hem de *S. aureus* izole edilirken 3 gözde ise herhangi bir etken izole edilmedi. Buzağlara tek doz Oksitetrasiklin LA (20 mg/kg, IM) uygulandıktan sonra rastgele her bir grupta 6 hayvan olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Birinci gruba, %40'lık dimetilsülfoksit +penisilin G 800.000 IU karışımı SK verilirken, ikinci gruba ise deksametazon+penisilin G 800.000 IU karışımı SK olarak verildi. Uygulamalara 3 gün arayla 4 kez devam edildi. Tedavi sonunda 2 vaka dışında tamamının iyileştiği saptandı. İyileşme süreleri açısından iki grup arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi. Sonuç olarak IBK olgularında deksametazona alternatif olarak %40'lık dimetilsülfoksitin tedavi kombinasyonunda kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Dimetilsülfoksit, IBK, *Moraxella bovis*, Tedavi

GİRİŞ

Sığırlarda enfeksiyöz keratokonjunktivitis (IBK), çoğunlukla yaz aylarında gözlenen ve ciddi ekonomik kayıplarla birlikte kalıcı görme kaybına neden olabilen bulaşıcı enfeksiyöz bir göz hastalığıdır (DeBower ve Thompson 1990; Gümüşsoy ve ark. 2006; McConnel ve ark. 2007; Işık 2008; Angelos 2015). Enfeksiyonun primer etkeni *Moraxella bovis*'tir (*M. bovis*). Ancak başka etkenlerin de hastalıktan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Gümüşsoy ve ark. 2006; Işık 2008; Abdullah ve ark. 2013). Hastalık direkt temas veya özellikle yüz sinekleri (*musca autumnalis*) aracılığıyla yayıldığı için genellikle sürü problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Yılın her döneminde görülebilmeye rağmen en sık olarak yaz aylarında karşılaşmaktadır (George 1990; Brown ve ark. 1998). Hastalıktan en çok etçi sığırlar etkilenirken, 3 haftadan büyük buzağularda görülme sıklığı az değildir. Hastalık fotofobi, blefarospazm ve epifora ile başlayan ve konjunktivitis ile birlikte kornea merkezinden periferine doğru ilerleyen değişik derecelerde, korneal opasite, ödem ve ülserasyonla karakterize bir seyir izler (Whittier ve ark. 2009; Sancak 2012; Angelos 2015). Tedavi edilmediği takdirde perforasyonla birlikte limbal sınırdan kornea merkezine doğru ilerleyen damarlaşma tablosu görülebilmektedir (Gümüşsoy ve ark. 2006; Işık 2008).

IBK ile mücadelede aşılama çalışmaları çok faydalı olmadığı için antibiyotik uygulamaları hala en uygun seçenektir (Brown 1998; Cullen ve ark. 2016). Tedavinin başarılı olması doğru antibiyotik seçimi ile bunun uygulanmasını takiben oküler dokuda ve gözyaşında dağılımının bilinmesine bağlıdır. *M. bovis*'in yapılan in vitro antibakteriyel duyarlılık testlerinde; ampisilin, cephalosporin, nitrofuranlar, penisilin, sulfonamidler, tilmicosin, trimetoprim-sulfonamide ve cloxacillin, erythromycin, gentamicin, oxytetracycline ve streptomycin'e duyarlı oldukları bilinmektedir (McConnel ve ark. 2007). Özellikle uzun etkili tetrasiklinler 20mg/kg IM olarak uygulandığında ilaç konsantrasyonu uzun süre MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) seviyelerinde korunabildiği için gözyaşına geçişi düşük miktarda olsa bile etkilidir. Bu nedenle özellikle etçi sığır işletmelerinde en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Sütçü işletmelerde ise süten arınma süresi kısa olan ilaçlar (penisilinler ve sefalosporinler) daha çok tercih edilmektedir (DeBower ve Thompson 1990; Brown ve ark. 1998; Sancak 2012). Kullanılacak antibiyotiklerin subkonjunktival enjeksiyon veya topikal olarak uygulanabildiği bilinmektedir (McConnel ve ark. 2007). Subkonjunktival enjeksiyon ile uygulanan ilaç, topikal uygulamaya göre oküler dokuya daha yüksek konsantrasyonda geçiş yapar (Oury ve ark. 2002; McConnel ve ark. 2007). Penisilinler genellikle subkonjunktival olarak kullanılırken diğer antibiyotiklerin çoğu parenteral olarak önerilmektedir (DeBower ve Thompson 1990; McConnel ve ark. 2007; Sancak 2012; Yazar ve ark. 2016).

Erken dönemdeki IBK vakalarında tek başına parenteral antibiyotiklerle başarılı sonuçlar elde edilirken (Oury ve ark. 2002), gecikmiş vakalarda tedavi için daha uzun sürelere ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu durum hem hayvanın verim özelliğine göre ekonomik kayıplara neden olabilmekte hem de tedavi giderlerini artırmaktadır (DeBower ve Thompson 1990). Bu gibi durumlarda iyileşmenin daha hızlı olması için parenteral uygulamalara ilaveten bazı destekleyici lokal uygulamaların faydalı olabileceği bildirilmiştir (Sancak 2012; Angelos 2015). Bu amaçla kullanılan ilaçlardan birisi de antiinflamatuvar etkili bir kortikosteroid olan deksametazon'dur (McConnel

ve ark. 2007; Sancak 2012). Ancak kortikosteroidlerin özellikle korneal ülser geliştikten sonra uygulanması iyileşmeyi geciktirdiği (Alio ve ark. 1994; Sancak 2012; Abdullah ve ark. 2013) için kullanımı halen tartışma konusudur. Bu nedenle kortikosteroidlere alternatif olarak etkinliği daha önce farklı göz çalışmalarında (Laria ve ark. 1997; Balicki 2007; Balicki 2008; Altan ve Oğurtan 2017) gösterilmiş olan antiinflamatuvar-antioksidan özellikli dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmasının IBK'nın tedavisinde etkili olabileceği düşünülerek bu çalışma planlandı. Bu bağlamda parenteral oksitetrasiklin uygulamasını takiben subkonjunktival prokain penisilin G-deksametazon ile prokain penisilin G-DMSO kombinasyonlarının IBK tedavisinde iyileştirici etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan sayısı

Çalışmada doğal enfekte IBK görülen bir sürüdeki 12 buzağı kullanıldı.

Anamnez ve klinik gözlem

Hastalığın görüldüğü sütçü sığır işletmesinde alınan anamnezde hayvanlarda önce aşırı bir gözyaşı akıntısı ve 1-2 gün içerisinde kornea merkezinde beliren bir beyazlaşma (opasite) ve 2-3 gün içerisinde de beyaz alanın periferine doğru yayılarak genişlediği öğrenildi. Problemin yaklaşık 6 aydır devam ettiği erişkin sığırlarda başladığı ve 1 aydan beridir de buzağularda ortaya çıktığı ve daha şiddetli seyrettiği öğrenildi. Hastalığın ilk çıktığı zamandan beri çeşitli antibiyotikler farklı uygulama yolları ile kullanılmasına (IM, göze püskürtme ve topikal vb) rağmen kontrol altına alınmadığı bilgisi alındı (Tablo 1). Hastalığın görüldüğü buzağuların tek tek klinik muayeneleri ve mikrobiyolojik analizleri yapıldı. Klinik belirtilere göre hastalığın evresi belirlendi (Abdullah ve ark. 2013). Ayrıca hastalıklı gözler %1'lik florescein strip (Haag Streit international- Koeniz, Switzerland) ile boyanarak (Resim 1A) kornealardaki hasarın şiddeti Kibar ve ark. (2006)'nın yaptığı klinik skorlama'ya göre 1-6 arasında derecelendirildi. Buna göre: (1) normal göz; (2) korneal ülserasyon olmaksızın IBK belirtilerinden bir veya daha fazlası; (3) korneal ülser çapı < 5 mm; (4) korneal ülser çapı ≥ 5 mm; (5) korneal perforasyon; (6) görme kaybı şeklinde belirlenerek veriler kayıt altına alındı (Tablo 2). Klinik muayeneler esnasında tek kullanımlık malzemeler (eldiven, enjektör vs) kullanılarak olası bir kontaminasyonun oluşması engellendi.

Bakteriyolojik kültür, izolasyon ve identifikasyon prosedürü

Gözde oluşan probleme neden olan etkenin belirlenmesi için numuneler toplandı. Bu amaçla her bir hayvanda inferior konjunktival forniks'den aseptik koşullarda steril svaplar yardımıyla sürüntü örnekleri alındı. Bu örnekler önceden besi yeri olarak hazırlanan Amies Transport Medium (Oxoid) içerisine konularak zaman kaybetmeden laboratuvara getirildi. Etken izolasyonu amacıyla alınan her bir svap numunesinin % 7 koyun kanı içeren Blood Agar Base No.2 (Merck) ve MacConkey Agar'a ekimleri yapıldı. Petri aerobik koşullarda, 37 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucu besi yerlerinde oluşan grimsi, düzgün kenarlı, parlak, besiyerine hafifçe gömük, hemolitik ve nonhemolitik kolonilerin identifikasyonu için; Gram boyama, hareket, katalaz ve oksidaz ile birlikte diğer biyokimyasal testlerden yararlanıldı (Kibar ve ark. 2006; Abu Samra ve ark. 2016).

Tedavi planlaması ve gruplar

Çalışmaya dahil edilen 12 buzağı rastgele 2 gruba ayrıldı. Tüm buzağılara tek doz uzun etkili Oksitetrasiklin (Primamycin LA, Zoetis, 20 mg/kg IM) yapıldıktan sonra her bir gruba uygulanan tedavi protokolleri aşağıdaki gibi oluşturuldu.

1. Grup: Subkonjunktival Prokain penisilin G (800.000 IU, Tüm Ekip) + Deksametazon %2 (Vetakort, Vetaş, İstanbul) karışımı 3 gün arayla 4 uygulama (n:6)

2. Grup: Subkonjunktival Prokain penisilin G (800.000 IU, Tüm Ekip) + DMSO %40 (Merck) karışımı 3 gün arayla 4 uygulama (n:6)

Subkonjunktival uygulamalar, her bir göze lokal anestezi damlatıldıktan (proparacaine hydrochloride, Alcaine 0.5%, Alcon, İstanbul) 10 dk sonra üst bulbar konjunktival kese içerisine her enjeksiyonda farklı enjektör (1 ml, 26G, 10mm) kullanılarak yapıldı. Uygulama miktarı hayvanın büyüklüğü (kg/ağırlık) ve konjunktival toleransı dikkate alınarak 0,5-1 ml olarak belirlendi. Vakaların 2'sinde lezyonlar çok şiddetli olduğu için ayrıca geçici tarsorafi yapıldı. Tedavi etkinlikleri, korneal ülser başta olmak üzere IBK'da tespit edilen klinik belirtilerin düzelmesi, buzağılardaki iyileşme süreleri ile birlikte haftalık olarak yapılan bakteriyolojik analizlere göre belirlendi (Tablo 1).

İstatistik

Çalışmada ortalama iyileşme süreleri ile klinik skorlama verileri için nonparametrik Mann-Witney U testi uygulandı. İstatistiksel analizlerde SPSS 19.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilirken $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

BULGULAR

Klinik gözlem bulguları

Hastalığın çıkış döneminin kış mevsimi (Ocak-Şubat ayında) olduğu belirlendi. İşletmede yapılan gözlemlerde hayvanlardan elde edilen gübrelerin hayvanların barındığı alana çok yakın olduğu ve bu gübre yığını etrafında bol miktarda yüz sineklerinin varlığı dikkati çekti. Hastalığın

asıl kaynağının ise erişkin inekler olduğu ve bunlardan sineklerle taşındığı düşünüldü. Buzağuların cinsiyetlerine bakıldığında 5'inin erkek, 7'sinin ise dişi olduğu görülürken, yaşları 20 gün ile 5 aylık arasında idi. Klinik muayenede buzağılarda gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi ile birlikte değişik derecelerde konjunktivitis, korneal opasite, ödem, ülser ve perforasyon bulguları tespit edildi (Resim 1B, C, D, E). Buzağılarda tespit edilen bu klinik bulgular Tablo 1'de sunulmuştur.

Vakaların çoğunluğu Evre 2 olarak belirlenirken (Tablo 1) üç vakada Evre 3 ve bir vakada ise Evre 4 olduğu belirlendi. Evre 2 olan buzağılarda gözyaşı akıntısı, konjunktival hiperemi, blefarospazm ve kornea merkezinde küçük opak alan belirlenirken, Evre 3 olanlarda ise korneal ülserasyon ile birlikte korneanın gri-beyaz bir hal aldığı yaygın ödem tablosu görüldü (Resim 1D). Evre 4 olan buzağılarda korneal ülserle birlikte iris proplasusu (Resim 1C) saptandı. Her iki grupta da tarsorafi yapılan 2 vaka dışında tüm buzağılarda süreleri değişmekle beraber klinik iyileşmenin sağlandığı belirlendi (Tablo 1, Resim 1F). İyileşme süreleri 1. grupta ortalama $13,60 \pm 3,65$ gün, 2. grupta ise $13,80 \pm 1,64$ gün olarak belirlendi. Ayrıca korneal hasarın belirlendiği klinik skorlama verilerine göre her iki grupta da 1'er vaka dışında IBK bulgularının tamamen düzeldiği, korneal ülserin iyileştiği ve buzağılardaki görme probleminin ortadan kalktığı saptandı. Grup içinde haftalık skorlar arasında 1 ile 4. haftalar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p < 0.05$, Tablo 2). Her iki grup arasında ise tedavi öncesi ve sonrası skorlama verileri arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi (Tablo 2).

Bakteriyolojik analiz bulguları

Bakteriyolojik etken analizinde hayvanların 5'inde sadece *M. bovis*, 1'inde hem *M. bovis* ve hem de *E. coli*, 1'inde hem *M. bovis* ve hem de *S. aureus*, 1'inde hem *E. coli* ve hem de *S. aureus*, 1 gözde ise sadece *S. aureus* izole edildi. Buna karşın 3 gözde ise herhangi bir etken izole edilmedi. Tedaviden sonra yapılan haftalık bakteriyolojik sürüntü örneklerinde herhangi bir etken izole edilmedi.



Hasarlı gözlerin fluorescein ile boyanması



Kornea merkezinde opak alanın görüntüsü



Kornea merkezinde perforasyon (iris prolapsusu)



Korneada şiddetli ödem, ülser ve periferden merkeze uzanan damarlaşma.



Grup 1-6 no'lu buzağıda tedavi öncesi klinik görünümü



Grup 1-6 no'lu buzağıda tedavi sonrası klinik görünümü

Şekil 1. Çalışmadaki vakalara ait görüntüler

Figure 1. Case images of the study

Tablo 1. Buzağılara ait klinik, anamnez ve tedavi bilgileri
Table 1. Clinical, anamnesis and treatment data of the calves

No	Tür	Cinsiyet	Yaş	Belirti	Bakteri	Evre	Tedavi grubu	İyileşme Süresi (gün)	Öncesinde tedavi yapılmış	Sonuç
1	Buzağı	Erkek	3,5 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi, gözün merkezinde küçük opak alan	<i>E. coli + S. aureus</i>	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+DMSO %40 SK	10	Bir gün önce IM Tulatromisin ve Danofloksasin uygulanmış	İyileşti
2	Buzağı	Erkek	3 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi, gözün merkezinde küçük opak alan	<i>M. bovis + E. coli</i>	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+DMSO %40 SK	11	Herhangi bir uygulama yapılmamış	İyileşti
3	Buzağı	Erkek	3,5 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi keratitisi gözde perforasyon var	<i>M. bovis</i>	4	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+DMSO %40 SK ve göze geçici tarsorafi uygulandı.	-	Bir gün önce IM Tulatromisin ve Danofloksasin uygulanmış	Düzelme yok
4	Buzağı	Dişi	3 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi kornea merkezinde küçük opak alan	Üreme yok	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+DMSO %40 SK	12	Bir gün önce IM Tulatromisin ve Danofloksasin uygulanmış	İyileşti
5	Buzağı	Erkek	3,5 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi, kornea merkezinde opasite	Üreme yok	3	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+DMSO %40 SK	17	Bir gün önce IM Tulatromisin ve Danofloksasin uygulanmış	İyileşti
6	Buzağı	Dişi	4 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi, korneayı kaplamış opasite ve ülser	<i>M. bovis,</i>	3	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+DMSO %40 SK	18	Herhangi bir uygulama yapılmamış	İyileşti
7	Buzağı	Dişi	20 gün	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi	<i>M. bovis</i>	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+ Deksametazon SK	12	Herhangi bir uygulama yapılmamış	İyileşti
8	Buzağı	Erkek	4 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi, Gözde şiddetli ödem, damarlaşma var	<i>M. bovis</i>	4	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+ Deksametazon SK ve göze geçici tarsorafi uygulandı	-	Herhangi bir uygulama yapılmamış	Düzelme yok
9	Buzağı	Erkek	1,5 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi, kornea merkezinde küçük opak alan	<i>S. aureus</i>	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+ Deksametazon SK	13	Herhangi bir uygulama yapılmamış	İyileşti
10	Buzağı	Dişi	3,5 ay	Gözyaşı akıntısı, kornea merkezinde opak alan	Üreme yok	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+ Deksametazon SK	16	Florfenicol IM (2 doz) üç gün arayla yapılmış)	İyileşti
11	Buzağı	Dişi	4,5 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi kornea merkezinde küçük opak alan	<i>M. bovis ve S. aureus</i>	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+ Deksametazon SK	15	Herhangi bir uygulama yapılmamış	İyileşti
12	Buzağı	Dişi	4,5 ay	Gözyaşı akıntısı, blefarospazm, fotofobi kornea merkezinde küçük opak alan	<i>M. bovis</i>	2	Oksitetrasiklin İM, penisilin 800 IU+ Deksametazon SK	13	Herhangi bir uygulama yapılmamış	İyileşti

Tablo 2. Gruplara ait tedavi öncesi ve sonrası skorlama ve istatistik verileri**Table 2.** Pre-and post-treatment scoring and statistical data of groups

No	Oksi+Pen-DMSO			Oksi+Pen-DEKS		
	Uygulama öncesi	Uygulama sonrası 1. hafta	Uygulama sonrası 2. hafta	Uygulama öncesi	Uygulama sonrası 1. hafta	Uygulama sonrası 2. hafta
1	3	1	1	3	1	1
2	3	1	1	5	4	3
3	5	4	3	2	1	1
4	2	1	1	2	2	1
5	4	2	1	3	2	1
6	3	2	1	3	1	1
Ort	3.33±1.03^a	1.83±1.17^{ab}	1.33± 0.82^c	3.00±1.10^a	1.83±1.17^{ab}	1.33± 0.82^c

Aynı satırdaki farklı harfler (a, b, c) istatistiksel olarak önemlidir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, sığırlarda ve buzağılarda daha çok sürü problemi şeklinde karşılaşılan IBK'nın tedavisinde tek doz sistemik ile kombine edilen lokal ilaç uygulamalarıyla oküler dokulardan bu hastalığın ana etkeni olan *M. bovis*'in daha hızlı sürede elemine edildiği belirlendi. Bununla ilgili daha önceleri yapılan farklı çalışmalarda (Kibar ve ark. 2006; Gümüşsoy ve ark. 2007) sadece subkonjunktival yapılan ilaç uygulamalarında başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen etkenin oküler dokulardan elemine edilmesinin zaman aldığı görülmüştür. Bu nedenle yapılan çalışmadaki gibi uygulama yoluna uygun ilaçların sistemik ve subkonjunktival yolla uygulanmasıyla tedavi sürecinin kısaldığı ve dolayısıyla hayvanın konforunun düzelmesiyle beraber oluşabilecek ekonomik kayıpların azaltılabileceği düşünülmektedir.

Dimetilsülfoksit, iyi bir antioksidan olması yanında antiinflamatuvar, analjezik, antibakteriyel özelliklere sahip bir kimyasal maddedir. Önemli bir diğer özelliği ise küçük molekül yapısından dolayı dokulara hızlı bir şekilde penetre olma yeteneğine sahip olmasıdır. Bu özelliğinden ötürü membranlardan kolayca geçebilmekte ve ayrıca diğer ilaçların etkinliğini artırıcı özelliği de bulunmaktadır (Brayton 1986; Jacob ve Herschler 1986; Altan ve Oğurtan 2017). DMSO'nun bu özellikleri sebebiyle son yıllarda göz hastalıklarının tedavisinde tek başlarına ya da farklı ilaçlarla kombine olarak kullanıldığında başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Balicki 2007; Balicki 2008; Altan ve Oğurtan 2017). DMSO'nun göz hastalıklarında kullanılmasının nedenlerinden bir tanesi kortikosteroidler ve non-steroidlerin göz hastalıklarında topikal olarak kullanımının iyileşmeyi geciktirmesi sebebiyle hala bir tartışma konusu olmasıdır (Alio ve ark. 1994; Laria ve ark. 1997; Sancak 2012; Altan ve Oğurtan 2017). Bu çalışmada kortikosteroidlere alternatif olarak DMSO'nun analjezik, antiinflamatuvar, antioksidan, hızlı penetran ve beraber kullanıldığı maddenin dokulara yayılmasını kolaylaştırıcı özelliklerinden dolayı IBK olgularındaki korneal ülserlerin iyileşmesini hızlandırmada etkili olabileceği düşünülmektedir.

IBK tedavisinde amaçlardan birisi de *M. bovis*'in oküler dokudan elemine edilmesidir. IBK başarıyla tedavi edilirse, kornea ülseri kalıcı bir şekilde iyileşir; Bununla birlikte, eğer *M. bovis* oküler dokulardan elemine edilemezse, nükslerin olabileceği ve bu nedenle de uygulanan

antibiyotiğin oküler dokudaki MİK'i, dağılım hacmi ve dokuda kalma süresinin bilinmesi oldukça önemlidir (McConnel ve ark. 2007). Yapılan bir çalışmada subkonjunktival prokain penisilin G uygulanmasıyla konjunktival sekresyonlarda yeterli konsantrasyona ulaştığı görülmüştür (Abeynayake ve Cooper 1989). Yapılan bir klinik çalışmada ise subkonjunktival penisilin G ile uzun etkili oksitetrasiklinin parenteral uygulaması karşılaştırılmış ve hastalığa bağlı gelişen korneal ülserin iyileşme zamanı benzer sürede azalmıştır (George 1990). Bununla birlikte Allen ve ark. (1995) ise doğal enfekte IBK'lı hayvanlarda penisilin G'nin tekbaşına veya deksametazon ile kombine olarak üst palpebral konjunktiva içerisine 3 gün süreyle uygulanmasının etkinlik açısından tedavi edilmeyen hayvanlardan farklı olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise tek doz parenteral uzun etkili oksitetrasiklin uygulanmasını takiben penisilin G hem deksametazon ile hem de DMSO ile kombine edilerek SK yolla 3 gün arayla 4 kez uygulandığında özellikle Evre 2 ve Evre 3 IBK olgularında hem korneal ülserin iyileşme süresini kısalttığı ve hem de tedaviden sonraki 1. hafta da yapılan bakteriyolojik analizlerde *M. bovis*'in elemine edildiği ortaya konuldu. Bu nedenle hem buzağılar ve hem de sakin mizaçlı etçi sığırlar gibi kontrolü kolay hayvanlarda SK yolla uygulanan penisilin G ve analjezik-antiinflamatuvar ilaçların oküler dokuya yüksek konsantrasyonlarda penetrasyonu (McConnel ve ark. 2007; Angelos 2015) sebebiyle oldukça başarılı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca analjezik-antiinflamatuvar etki sayesinde hayvandaki fotofobi ve blefarospazm, konjunktivitis gibi yangısal belirtiler (Loy ve Brodersen 2014) azaldığı için çok daha kısa sürede hayvanın normal konforuna dönerek olası verim kayıplarının (Loy ve Brodersen 2014; Angelos 2015) engellenebileceği düşünülmektedir.

Buzağuların erişkinlere göre yeterli düzeyde kazanılmış bağışıklığa sahip olmaması (Oury ve ark. 2002; Gümüşsoy ve ark. 2006; Whittier ve ark. 2009) nedeniyle hastalığa daha duyarlıdırlar. Alınan anamnezde olduğu gibi işletmedeki sığırlarda da hastalık görülürken buzağılardaki gibi Evre 3 ve 4 IBK düzeyinde karşılaşılmaması bu veri ile uyumlu bulunmuştur.

IBK insidansının bahar aylarında başlayıp, yaz sezonunda pik yaptığı ve kış aylarında ise azalma eğilimi gösterdiği bilinir (Snowder ve ark. 2005). Ayrıca cinsiyet yönünden erkeklerin dişi buzağulara göre daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Oury ve ark. 2002). Ancak bu çalışmada

vakanın kış aylarında görülmesi ve buzağılardan çoğunun dişi olması adı geçen araştırmacılar tarafından farklılık gösterdiği görülmüştür.

IBK'nın ana etkeni olan *M. bovis*'in antibiyotiklere oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir (Brown 1998; Cullen ve ark. 2016). Çalışmadaki buzağılarda yapılan bakteriyolojik etken izolasyonunda hastalık semptomları görülen hayvanların bazılarında herhangi bir etken izole edilemediği dikkati çekti. Bunun sebebi olarak Tablo 1'de belirtildiği üzere çiftlikte hasta olan hayvanlara farklı zamanlarda farklı yollarla uygulanan antibiyotik tedavilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bu uygulamalar, bazı hayvanlarda mikrobiyal etkenlerin ortadan kalkmasına neden olurken, bazı hayvanlarda ise fırsatçı patojenlerin (*S. aureus* gibi) üremesine ortam sağlamış (Abdullah ve ark. 2013) olabileceğini göstermektedir.

Gümüşsoy ve ark. (2006) bir işletmede karşılaştıkları IBK vakalarında hayvanlardan elde edilen gübrelerin buzağılardan yakın çevresindeki ekim alanlarında kullanıldığını ve vektör sineklerin sebebi olarak bu gübrelerin olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da hayvanların bulunduğu alanda gübrelerin biriktirildiği ve adı geçen araştırmacılara benzer şekilde işletmede IBK'nın yayılmasından sorumlu sineklerin kaynağı olarak gübrelerin olduğu düşünülmektedir.

IBK'nın tek bir etken tarafından meydana getirilebileceği gibi miks etkenler tarafından da oluşabileceği bildirilmiştir (Okumuş ve ark. 2005; Whittier ve ark. 2009). Gümüşsoy ve ark. (2006), doğal enfekte IBK görülen bir sürüde yaptıkları bakteriyel izolasyon ve identifikasyon sonucunda *M. bovis* ile birlikte *E. coli*, *Proteus spp* ve *S. aureus*'u da izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise yukarıda adı geçen çalışmalar benzer şekilde *M. bovis* ile birlikte *E. coli* ve *S. aureus*'un izole edilmesi adı geçen araştırmacılarla uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan IBK olgularında tek doz parenteral oksitetrasiklin takiben %40'lık konsantrasyonda DMSO'nun, penisilin G ile birlikte subkonjunktival yolla deksametazona alternatif olarak tedavi kombinasyonunda kullanılabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abu Samra MT, Shuaib YS, Ryhan MIM, Bayomi MBM, Mohamed AOA, Ali AAN, Mohamed AEA, (2016). Infectious bovine keratoconjunctivitis in Al-silaite area, Khartoum state. *Sch J Agric Vet Sci*, 3(3), 227-233.
- Abdullah FFJ, Adamu L, Osman AY, Haron AW, Saharee AA (2013). Clinical management of stage III infectious bovine keratoconjunctivitis associated with *Staphylococcus aureus* in a dairy cow: A case report. *IOSR J Agric Vet Sci*, 4, 69-73.
- Abeynayake P, Cooper BS (1989). The concentration of penicillin in bovine conjunctival sac fluid as it pertains to the treatment of *Moraxella bovis* infection. (I) Subconjunctival injection. *J Vet Pharmacol Ther*, 12, 25-30.

- Alio JL, Ayala MJ, Mulet ME, Artola A, Ruiz JM (1994). Topical treatment of experimental acute corneal inflammation by dexamethasone and nonsteroidal drug. *Ophthalmic Res* 26, 87-94.
- Allen LJ, George LW, Willits NH (1995). Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc*, 206, 1200-1203.
- Altan S, Oğurtan Z (2017). Dimethyl sulfoxide but not indomethacin is efficient for healing in hydrofluoric acid eye burns. *Burns*, 43(1), 232-244.
- Angelos JA, (2015). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 31, 61-79.
- Balicki I (2007). The use of dexamethasone and dimethyl sulfoxide for chronic superficial keratitis treatment in dogs. Proceeding book ECVO meeting. *Vet Ophthalmol*, 10, 323-335.
- Balicki I, (2008). Application of dimethyl sulfoxide and cyclosporine in long-term treatment of chronic superficial keratitis in dogs. Proceeding book ECVO meeting. *Vet Ophthalmol*, 12, 61-70.
- Brayton CF (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. *Cornell Vet*, 76, 61-90.
- Brown MH, Brightman AH, Fenwick BW, Rider MA (1998). Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review, *J Vet Intern Med*, 12, 259-266.
- Cullen JN, Yuan C, Totton S, Dzikamunhenga R, Coetzee JF, da Silva N, Wang C, O'Connor AM, (2016). A systematic review and meta-analysis of the antibiotic treatment for infectious bovine keratoconjunctivitis: an update. *Anim Health Res Rev*, 17(1), 60-75.
- DeBower D, Thompson JR (1997). Infectious bovine keratoconjunctivitis. *Iowa State University Veterinarian*, 59, 20-24.
- George LW (1990). Antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Cornell Vet*, 80, 229-235.
- Gümüşsoy KS, Kibar M, Şahna K, Abay S (2006). İnfeksiyöz bovine keratokonjunktivitisin tedavisinde florfenikol ve sefuroksim sodyum uygulaması. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 3(1), 29-35.
- İşık N (2008). İnfeksiyöz bovine keratokonjunktivitisi sığırlarda *moraxella bovis*'in izolasyonu. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1 (1), 17-22.
- Jacob SW, Herschler R (1986). Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, 23, 14-27.
- Kibar M, Gümüşsoy KS, Öztürk A (2006). Evaluation of various antibiotic treatments in calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Turkish J Vet Sci*, 30, 553-559.
- Laria C, Alio JL, Ruiz-Moreno JM (1997). Combined non-steroidal therapy in experimental corneal injury. *Ophthalmic Res*, 29, 145-153.
- Loy JD, Brodersen BW (2014). *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *J Vet Diagn Invest*, 26, 761-768.
- McConnell CS, Shum L, House JK (2007). Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. *Aust Vet J*, 85, 65-69.
- Okumuş Z, Kireççi E, Kısa F, Kaya M (2005). Screening conjunctival bacterial flora and antibiogram tests in cattle. *J Anim Vet Adv*, 4, 845-847.
- Oury MP, Scharko P, Johns J (2002). Pinkeye in cattle. *Kentucky Cooperative Extension Services*, p.135.
- Sancak İG (2012). Enfeksiyöz sığır keratokonjunktivitisi (IBK). Çiftlik Hayvanları Oftalmolojisi. In "Temel Veteriner Oftalmoloji", Ed: Gelat KN, Avki S, Sancak İG, Medipress Matbaacılık, Malatya, Türkiye.
- Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL (2005). Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. *J Anim Sci*, 83, 507-518.
- Whittier WD, Currin J, Currin N (2009). Pinkeye in Beef Cattle. https://pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs_ext_vt_edu/400/400-750/400-750_pdf.pdf, Erişim tarihi; 15.08.2017.
- Yazar E, Traş B, Elmas M (2016). Veteriner İlaç. 2. Baskı, Olgun-Çelik Ofset, Konya, Türkiye.



Effects of Rosemary and Fennel Essential Oil Mix on Performance and Meat Lipid Oxidation in Quails

Şerife Şule CENGİZ

Uludağ University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Bursa, Turkey

Received: 08.02.2018

Accepted: 15.03.2018

SUMMARY

This study was conducted to determine the effect of essential oil mixtures (rosemary and fennel) added to the quail ration on the performance, carcass parameters (hot and cold carcass weight, carcass yield), butter and breast pH, meat colour (L*, a*, b*) and meat Malondialdehyde (MDA) level. A total of 240 Pharaoh quails (*Coturnix Coturnix Pharaoh*) were equally divided into three main groups containing 80 quails. Each main group was divided into 5 subgroups, each consisting of 16 animals. The study included a control treatment with no diet additives, and the treatments were as follows: 100 mg/kg rosemary and 100 mg/kg fennel essential oil (group I), 200 mg/kg rosemary and 200 mg/kg fennel volatile oil (group II) were added. The experiment was carried out for 42 days. At the end of the study, the live weight gain of group II that rosemary and fennel volatile oil were added to the rations at 200 mg/kg level, was higher than control group. Also, feed consumption and feed conversion rate of group II were statistically improved compared to both control and group I. Similarly, meat L*, a* and b* values of group II were differed significantly from the other groups. Ration enriched with rosemary and fennel volatile oil mixtures resulted in significant improvements in meat MDA value on 15 days compared to the control group (p<0.01). The differences between the other parameters determined in the study were not statistically significant. In conclusion, it was concluded that rosemary and fennel essential oil mixture could be used as natural feed additive substance at 200 mg/kg in quail rations in order to improve performance and meat quality parameters.

Key Words: Rosemary, Fennel, Quail, Performance, Meat lipid oxidation

ÖZET

Biberiye ve Rezene Uçucu Yağ Karmasının Bildırıcınlarda Performans ve Et Lipid Oksidasyonu Üzerine Etkileri

Bu çalışma, bıldırcın rasyonlarına ilave edilen uçucu yağ karışımlarının (UYK) (biberiye ve rezene) performans, karkas parametreleri (sıcak, soğuk karkas ağırlığı, karkas randımanı), göğüs ve but pH, et rengi (L*, a*, b*) ve malondialdehit düzeyi (MDA) üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürütüldü. Araştırmada 1 günlük yaşta toplam 240 adet Pharaoh (*Coturnix Coturnix Pharaoh*) bıldırcın 80 hayvandan oluşan 3 ana gruba ayrıldı. Her ana grup ise her biri 16 hayvandan oluşan 5 alt gruba ayrıldı. Kontrol grubuna uçucu yağ karması ilave edilmezken, I. gruba 100 mg/kg biberiye ve 100 mg/kg rezene uçucu yağı (%50:50), II. gruba 200 mg/kg biberiye ve 200 mg/kg rezene (%50:50) uçucu yağı ilave edildi. Araştırma 42. günde sonlandırıldı. Araştırma sonunda rasyonlarına 200 mg/kg düzeyinde biberiye ve rezene uçucu yağı ilavesi yapılan II. grubun canlı ağırlık kazancı kontrol grubuna göre yükseldi. Ayrıca, II. grubun yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı hem kontrol hem de I. gruba göre istatistikî önemde iyileşti. Benzer şekilde II. grubun et rengi L*, a*, b* değerleri diğer gruplardan istatistikî önemde farklı bulundu. Biberiye ve rezene UYK ile zenginleştirilmiş rasyonlar kontrol grubuyla kıyaslandığında 15. gün et MDA düzeyi üzerinde önemli iyileşmelere neden oldu (p<0.01). Araştırmada diğer parametreler arasındaki farkların istatistiksel anlamda önemli olmadığı belirlendi. Sonuç olarak, bıldırcın rasyonlarında biberiye ve rezene UYK'nın performans ve et kalite parametrelerini iyileştirebilmek amacıyla doğal katkı maddesi olarak 200 mg/kg düzeyinde kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Biberiye, Rezene, Bıldırcın, Performans, Et lipid oksidasyonu

GİRİŞ

Dünya ve Türkiye nüfusunun son yıllarda hızla artması,

insanların yeterli, dengeli ve sağlıklı gıda temini sorununu da beraberinde getirmiştir. Sağlıklı ve dengeli beslenme, bitkisel kökenli gıdaların yanı sıra hayvansal protein

kaynaklarının da yeterli ve dengeli düzeyde tüketilmesiyle mümkündür. Bu anlamda, kanatlı eti hem sağlığa yararlı olması hem de diğer protein kaynaklarına göre daha düşük maliyetli olması sebebiyle doğru beslenmede önemli bir besin kaynağıdır (Çiftçioğlu 2015). Ancak, kanatlı etinin doymamış yağ asitlerince zengin olması, lipid oksidasyonuna karşı duyarlılığını artırmaktadır (Florou-Paneri ve ark. 2005). Lipid oksidasyonu, öncelikle etin membran fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitlerinde başlamaktadır. Bu durum, etin işlenmesi, buzdolabında saklanması ve pişirilmesi esnasında meydana gelen en önemli problemlerden birisi olup, etin renginin, tadının ve besin değerinin kaybına ve raf ömrünün kısalmasına yol açmaktadır (Botsoglou ve ark. 2003). Bu olumsuz etkileri önlemek amacıyla E ve C vitamini gibi doğal antioksidanların yanı sıra bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) propil gallat (PG) tersiyel bütül hidrokinon (TBHQ) nordihidroguayenetasidi (NDGA) ve etoksiquin gibi sentetik antioksidanlar da fiyatlarının düşük olması nedeniyle uzun süre kanatlı hayvan beslemede kullanılmıştır. Ancak, sentetik antioksidanların kanser yapıcı ve mutajenik özelliklerinden dolayı kullanımlarına yasak getirilmiştir (Tang ve ark. 2001). Bu nedenle, gıda ve yem sektörü alternatif doğal antioksidan arayışına yönelmiştir. Böylece, sentetik antioksidanlara alternatif olarak gerek sağlık gerekse elde edilen ürün üzerinde herhangi bir yan etkisi olmayan aromatik bitkiler ve bunların ekstraktlarının kullanımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla, lipid oksidasyonunun geciktirilmesi bakımından sentetik antioksidanlara eşit veya onlardan daha yüksek aktiviteye sahip olan biberiye, adaçayı, kekik, sarımsak, üzüm çekirdeği ve çay ekstraktları bileşimlerdeki fenolik bileşiklerden dolayı doğal antioksidan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Namiki 1990). Böylece, oksidatif stresin hayvanlar üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması, hayvansal ürünlerin doğal antioksidanlarca zenginleştirilerek fonksiyonel gıda üretiminin gerçekleştirilmesi ve etin lipid oksidasyon stabilitesinin artırılarak raf ömrünün uzatılması öngörülmektedir.

Aromatik bitkilerde çok çeşitli aktif bileşenlerin bulunması hayvanlar üzerindeki etkilerini de değiştirebilmektedir. Pek çoğu iştahı ve yem tüketimini uyarırken, bir bölümü de tükürük salgısını ve safra asitlerinin sentezini uyararak, lipidlerin sindirim ve emilimini artırmaktadır (Christaki ve ark. 2011). Ayrıca, amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimlerin sekresyonunu ya da aktivitesini uyararak sindirilebilirliği iyileştirdiği bildirilmiştir (Hernandez ve ark. 2004). Bu bağlamda, doğada yetişen bazı bitki ekstraktlarının ve bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların ve bunların aktif bileşenlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sindirim sistemini uyarıcı özelliklerinden yararlanma konusu güncellik kazanmıştır. Ayrıca, aromatik bitkilerin ekstraksiyonu ile elde edilen uçucu yağların çoğu kimyasal yapı bakımından güvenli olarak kabul edilmekte ve başta gıda endüstrisi olmak üzere birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Çabuk ve ark. 2003; Şındak ve ark. 2017). Gelişmiş ülkelerde endüstriyel hayvansal ürünlerden organik hayvansal ürünlere geçişle birlikte başta antibiyotikler olmak üzere büyümeyi uyaran her türlü sentetik madde kullanımı yasaklanmıştır. Bu durumda, doğal ve güvenilir olan aromatik bitki ve ekstraktlarının performans artırıcı olarak kullanımı çok yerinde bir yaklaşım olacaktır.

Labiatae ailesinde yer alan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) en yüksek antioksidatif etkinliğe sahip bitkiler arasında yer almaktadır. Biberiyenin antioksidan aktivitesinin, yapısında bulunan fenolik rosmanol, 7-metilpirosmanol,

isorosmanol ve karnozik asit gibi diterpenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Estevez ve ark. 2007).

Rezene (*Foeniculum vulgare* Mill) ise *Apiaceae* familyasında yer alan ve antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahip aromatik bir bitkidir. Rezene uçucu yağının ana bileşenini (%60-70) trans-anethole oluşturmaktadır (Gulfraz ve ark. 2008). Uçucu yağlar, farklı bileşenlerden oluştukları için biyolojik etkileri açısından da farklılık göstermektedirler.

Biberiye ve rezene uçucu yağlarının farklı dozlarının (125, 200, 250, 500 ppm) bireysel olarak performans üzerine etkileri ve antioksidan özellikleri çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (Çiftçi ve ark. 2013; Türk ve ark. 2016; Ould ve ark. 2015). Daha önce tarafımızdan yapılan çalışmalarda rezene ve biberiye uçucu yağlarının tek başlarına 100, 200 ve 250 mg/kg dozları incelenmiştir (Cengiz ve ark. Çetin ve ark. 2017). Ancak kombine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar çok sınırlı sayıdadır (Çabuk ve ark. 2014). Bu çalışmada biberiye ve rezene uçucu yağ karmasının farklı iki dozunun (100 mg/kg ve 200 mg/kg), etlik bıldırcınların verim performansı ve et lipid oksidasyonu üzerine olan etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan, Yem Materyali ve Deneme Düzeni

Araştırmada 240 adet bir günlük yaşta Pharaoh (*Coturnix Coturnix Pharaoh*) erkek ve dişi bıldırcınlar kullanıldı. Araştırma 1 kontrol ve 2 deneme grubu olmak üzere toplam 3 ana gruptan oluşturuldu. Hayvanlar et tipi özel bıldırcın kafeslerinde ısı, ışık gibi çevre koşullarından ileri gelebilecek etkileşimleri ortadan kaldıracak şekilde her bir deneme grubu 5 alt gruba ayrıldı ve her alt gruba 16'şar hayvan yerleştirildi. Kontrol grubuna uçucu yağ karması ilave edilmezken, I. gruba 100 mg/kg biberiye ve 100 mg/kg rezene uçucu yağı (%50:50), II. gruba 200 mg/kg biberiye ve 200 mg/kg rezene (%50:50) uçucu yağı ilave edildi. Denemede kullanılan hayvanların besin maddesi gereksinimlerini karşılayacak rasyonlar (%24.80 HP ve 12.40 Mj/kg ME) hazırlanarak yem ham maddelerinin ve rasyonların ham besin madde miktarları Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda AOAC'de (2000) bildirilen yöntemlere göre belirlendi. Metabolize olabilir enerji düzeylerinin hesaplanmasında ise Carpenter ve Clegg'in (1956) önerdiği formül kullanıldı. Araştırma, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan bıldırcın ünitesinde yürütüldü. Hayvanlara grup yemlemesi uygulandı ve tüketebilecekleri miktarlarda yem ve su sürekli olarak önlerinde hazır bulunduruldu (*ad libitum*). Deneme süresince kullanılan yemlerin ham madde bileşimleriyle, besin maddesi ve enerji kapsamları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Performans ve Et Kalite Parametreleri

Canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışının belirlenmesi: Hayvanlar, denemenin başlangıcında ve sonrasında haftalık olarak tartılarak canlı ağırlıkları belirlendi. Tartımlar arası farktan canlı ağırlık artışları hesaplandı.

Yem tüketimi, yemden yararlanma oranının belirlenmesi: Her bir tekrar grubunun yem tüketimi haftada bir 2 grama duyarlı terazide yapılan tartımlar ile belirlendi. Yine aynı dönemlerdeki yemden yararlanma değerleri ise bir kilogram canlı ağırlık artışı için tüketilen yem miktarı olarak hesaplandı.

Sıcak ve Soğuk Karkas Randımanının Belirlenmesi: Karkas parametreleri açısından değerlendirilmek üzere her gruptan 25 adet olmak üzere toplam 75 adet erkek hayvan rasgele seçilerek tartıldı. Karkaslar kesim işlemi tamamlandıktan hemen sonra tartılarak sıcak karkas ağırlıkları belirlendi. Soğuk karkas ağırlıklarını tespit etmek amacıyla karkaslar +4°C'de 18 saat bekletildi ve tartımları yapıldı.

Karkas randımanı, aşağıda gösterilen formül ile belirlendi:

$$\text{Randıman, \%} = \frac{\text{Soğuk karkas ağırlığı (g)}}{\text{Kesim öncesi ağırlığı (g)}} \times 100$$

Et Örneklerinde Tiyoarbutirikasit Reaktif Maddelerinin (TBARS) Analizleri: Araştırma sonunda her gruptan 10 adet olmak üzere toplam 30 hayvana ait göğüs eti örnekleri alınarak buzdolabı koşullarında (+4°C) depolandı ve depolamanın 1, 7. ve 15. günlerinde TBARS analizleri yapılarak etin lipid oksidasyona karşı dayanma gücünün göstergesi olan MDA düzeyi ölçüldü.

Et Örneklerinde Renk ve pH Analizleri: Bildircin göğüs eti örneklerinin kesit yüzeyi renk yoğunlukları, kolorimetre cihazı (CR-400 Minolta Co, Osaka, Japan) kullanılarak belirlendi. Üç boyutlu renk ölçümünü esas alan Uluslararası Aydınlatma Komisyonu CIELab (Commission Internationale de l'Eclairage) tarafından verilen kriterlere göre L*, a* ve b* değerlerinin ölçümleri yapıldı. Bu kriterlere göre; L*; 0=siyah, 100=beyaz (koyuluk/açıklık); a*; +60=kırmızı, -60=yeşil ve b*; +60=sarı, -60=mavi renk yoğunluklarını göstermektedir (Hunt ve ark. 1991). Her ölçümden önce kolorimetre standartize edildi. Her bir örnekten 4 adet ölçüm yapıldı ve ortalamalar alınarak renk değerleri elde edildi.

Bildircin göğüs ve but eti örneklerinin pH'sını belirlemek için, kesimden 12 saat sonra pH metre (SevenGo™, Mettler Toledo AG, CH-8603, SG2, Schwerzenbach, Switzerland) kullanılarak göğüs ve but etinin iki farklı bölgesinden ölçüm yapıldı. Bu iki farklı değerlerin ortalaması her örneğin pH değeri olarak alındı.

Uçucu Yağların Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan biberiye uçucu yağı (Yoğunluk: 0,895, Sesim Sağlık Ürünleri, Ankara, Türkiye) ve rezene uçucu yağı (Yoğunluk: 0,961, Düzey Laboratuvar Ürünleri, İstanbul, Türkiye) hidrodistilasyon yöntemi ile elde edildi (Tablo 3). Uçucu yağların etken madde bileşenlerinin tespitinde GS-MS yöntemi kullanıldı. Ekstrakte edilen uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanması için Metil silikon kolonlu DB-1 (50mx0.22mm) GC 95°C'den 240°C'ye dakika da 4°C artacak şekilde sıcaklık programı uygulandı. 250°C'ye vardığında enjeksiyon yapılarak FID dedektörü aracılığı ile oluşturulan kromatogramlar MS (kütle Spektroskopisi) veya MS/MS ile tanımlanmaları sağlandı. Değerlerin kantitatif olarak hesaplanmasında internal standart kullanıldı (Pala-Paul ve ark. 2004).

İstatistiksel Analizler

Gruplara ait istatistik hesaplamalar ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılığın önemini belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arasındaki farkın önemlilik kontrolü için ise Tukey testi uygulandı (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 1995). Gruplar arasında erkek-dişi oranı bakımından bir farklılığın olup olmadığının kontrolünde Ki-kare testi kullanıldı (Düzgüneş 1963). İstatistik analizler SPSS 22.00 (Inc., Chiago, II, USA) programında gerçekleştirildi.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*) uçucu yağlarının bileşimleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo incelendiğinde biberiye uçucu yağ bileşiminin büyük bir kısmının α-pinen, terpinen, borneol ve camphor bileşiminden oluştuğu görülmektedir. Rezene uçucu yağının kimyasal kompozisyonu açısından bileşimin büyük bir kısmını ise *trans*-anethole, fenchone, estragol ve 1,8-cineole oluşturmaktadır.

Tablo 1. Rasyon bileşimi ve besin madde kompozisyonu
Table 1. Composition and nutrient content of diets

Ham maddeler	Oranları (%)
Mısır	43.90
Soya Fasülyesi Küşesi	36.30
Buğday	8.12
Mısır Gluteni	5.00
Bitkisel Yağ	3.00
Kireçtaşı	1.60
DCP	0.60
Tuz	0.30
L-Lizin	0.35
DL Metiyonin	0.40
L-Threonine	0.08
Vitamin- mineral premiksi ^a	0.35
Besin madde değerleri	
Kuru madde, %	88.12
Metabolik enerji, MJ/kg ^b	12.40
Ham protein, %	24.80
Ham yağ, %	5.02
Ham kül, %	7.40
Kalsiyum, %	1.00
Fosfor, %	0.62

^a Rasyonun her kilogramında: 3000000 IU Retinol (A vitamini), 1200000 IU Kolekalsiferol (D₃ vitamini), 0.36 g Tokoferol (E vitamini), 1 mg Menadion (K vitamini), 3 mg Tiamin, 4mg Riboflavin, 3 mg Pridoksin, 0.003 mg Kobalamin (B₁₂ vitamini), 10 mg Pantotenik asit, 20 mg Niasin, 40 mg Folik asit, 1 g Kolin, 0.3 mg Biotin, 6 mg Cu, 300 mg I, 100 mg Fe, 0.2 mg Se, 60 mg Mn, 50 mg Zn; ^b Rasyonların metabolize olabilir enerji içeriklerinin belirlenmesinde Carpenter ve Clegg'in (1956) denklemi kullanılmıştır.

Araştırma sonucunda elde edilen performans verileri incelendiğinde II. grubun deneme sonu canlı ağırlığı ve canlı ağırlık kazancı kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (P<0.05). Yem tüketimi (P<0.05) ve yemden yararlanma oranı (P<0.01) bakımından ise II. grubun ortalama değerleri diğer gruplara göre istatistiki düzeyde iyileşmiştir (Tablo 4). Araştırmada karkas parametrelerine ilişkin değerler Tablo 5'te verilmiştir. Tablo 5'te de görüleceği gibi gruplar arasında ortalama kesim öncesi ağırlıkları, sıcak ve soğuk karkas ağırlıkları bakımından farklılık oluşmamıştır. Benzer şekilde karkas randımanı ile but ve göğüs pH değerleri açısından da istatistiki önemde bir farklılık bulunmamıştır (P>0.05). Bildircinlarda diğer kümes kanatlılarının aksine dişi hayvanlar, erkek hayvanlara oranla daha fazla canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışı göstermektedirler (Sarıca ve ark. 1998). Bu özellik dikkate alındığında gruplarda mevcut erkek dişi oranının birbirinden farklı olup olmadığını incelemek amacıyla "Ki kare istatistiği" ile "Bağımsızlık

kontrolü" yapılmıştır. Bu analiz sonucu elde edilen verilere göre ($\chi^2=0.433$) grupların erkek dişi oranlarının birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir.

Derisiz göğüs eti L* değeri bakımından, II. grubun et rengi, kontrol ve I. gruba göre istatistiki önemde daha açık bulunmuştur ($P<0.001$). Benzer şekilde derisiz göğüs eti a* (kırmızılık) ve b* (sarılık) değerleri bakımından II. grup diğer iki gruba göre istatistiki önemde farklı olmuştur ($P<0.001$) (Tablo 5).

Biberiye ve rezene uçucu yağ kombinasyonlarının antioksidan etkileri denemenin 1, 7 ve 15. günlerinde TBARS analizleri ile belirlenmiştir (Tablo 6). Analizin 1. ve 7. gününde grupların et lipid oksidatif stabiliteyi arasında fark görülmezken ($P>0.05$) 15. günde bu benzerliğin ortadan kalktığı ve uçucu yağ eklenen I ve II. grubun MDA düzeyinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük olduğu saptanmıştır ($P<0.01$).

Tablo 3. Araştırmada kullanılan biberiye ve rezene uçucu yağların özgül ağırlıkları ve dozajları

Table 3. Specific gravities and dosages of rosemary and fennel volatile oils

	Spesifik gravite ^a	Kontrol	I. Grup	II. Grup
Biberiye Uçucu Yağı (50 kg^b)	0.895 g/ml	-	100 mg/kg	200 mg/kg
		-	(0.117 ml)	(0.234 ml)
		-	5.85 ml	11.70 ml
Rezene Uçucu Yağı (50 kg^b)	0.961 g/ml	-	100 mg/kg	200 mg/kg
		-	(0.104 ml)	(0.208 ml)
		-	5.20 ml	10.40 ml

^a Biberiye ve rezene uçucu yağlarının özgül ağırlık değerleri rasyonlara katılma miktarları belirlenirken dikkate alınmıştır.

^b Rasyonlar, verilen formül uyarınca 50 kg'lık bölümler halinde haftalık olarak hazırlanmıştır.

Tablo 2. Araştırmada kullanılan biberiye ve rezene uçucu yağının aktif bileşenleri

Table 2. Active ingredients of rosemary and fennel essential oil used in the research

Biberiye Uçucu Yağı	
Aktif bileşen	%
α-Pinene	69.03
Borneol	4.00
Camphor	4.80
Cineol	2.20
Cymen	1.80
Verbenone	1.90
Terpinene	10.20
Mirsene	2.12
β-pinene	1.20
Limonene	0.83
Terpinolen	0.85
Rezene Uçucu Yağı	
3-methylbutanol	0.20
α-Pinene	0.59
β-pinene	0.30
β-myrcene	1.30
p-cymene	1.32
1,8-cineole	3.20
γ-Terpinene	2.30
Fenchone	10.50
Linalool	1.30
Camphor	0.40
Trans-Anethole	70.58
Estragole	5.01

Tablo 5. Bildircin rasyonuna biberiye ve rezene uçucu yağ karması ilavesinin, sıcak karkas ağırlığı, soğuk karkas ağırlığı, karkas randımanı, et pH'sı ve et L*, a*, b* değerleri üzerine etkileri

Table 5. Effects of rosemary and fennel essential oil addition on quail ration, on hot carcass weight, cold carcass weight and carcass yield, meat pH and meat L*, a*, b* level

	Kontrol		Grup I		Grup II		P değeri
<i>Biberiye uçucu yağı (mg/kg)</i>	0		100		200		
<i>Rezene uçucu yağı (mg/kg)</i>	0		100		200		
Cinsiyet oranı	38/42		42/38		39/41		0.805
Parametreler							
Kesim Öncesi Ağırlığı, g	169.28	± 3.01	174.14	± 3.08	173.22	± 3.41	0.518
Sıcak Karkas Ağırlığı, g	133.02	± 2.57	136.66	± 2.42	134.51	± 2.88	0.617
Soğuk Karkas Ağırlığı, g	129.07	± 2.50	132.48	± 2.41	132.00	± 2.32	0.559
Karkas Randımanı, %	76.31	± 0.87	76.15	± 0.74	76.30	± 0.36	0.983
But pH	6.44	± 0.31	6.52	± 0.04	6.47	± 0.03	0.193
Göğüs pH	5.98	± 0.02	6.01	± 0.03	6.03	± 0.02	0.485
L* değeri	36.63 ^b	± 0.48	38.62 ^b	± 0.84	47.18 ^a	± 1.41	0.000
a* değeri	10.43 ^a	± 0.34	10.39 ^a	± 0.34	12.94 ^b	± 0.47	0.000
b* değeri	1.25 ^b	± 0.22	2.53 ^b	± 0.47	6.22 ^a	± 0.60	0.000

^{ab}: Aynı satırda değişik harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.001$).

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.

Tablo 4. Bildircin rasyonuna biberiye ve rezene uçucu yağ karması ilavesinin ortalama canlı ağırlık (CA), canlı ağırlık artışı (CAA), yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı üzerine olan etkileri**Table 4.** Effects of rosemary and fennel essential oil addition on quail ration, on average body weight, body weight gain, feed consumption and feed conversion rate

	Kontrol		Grup I		Grup II		P değeri
Biberiye uçucu yağı (mg/kg)	0		100		200		
Rezene uçucu yağı (mg/kg)	0		100		200		
Canlı Ağırlık (g) (n=80)							
1. Hafta	9.155	± 0.150	9.389	± 0.216	9.796	± 0.208	0.062
2. Hafta	31.704 ^b	± 0.604	35.809 ^a	± 0.511	36.404 ^a	± 0.582	0.000
3. Hafta	63.190 ^b	± 0.843	70.563 ^a	± 0.686	72.927 ^a	± 0.836	0.000
4. Hafta	105.677 ^b	± 1.187	108.808 ^b	± 0.978	112.794 ^a	± 0.988	0.000
5. Hafta	149.250 ^b	± 1.398	153.625 ^{ab}	± 1.414	154.724 ^a	± 1.226	0.012
6. Hafta	169.890 ^b	± 1.984	175.221 ^{ab}	± 2.016	177.788 ^a	± 1.937	0.019
7. Hafta	188.617 ^b	± 2.033	193.346 ^{ab}	± 2.606	197.741 ^a	± 2.431	0.029
Canlı Ağırlık Artışı (g) (n= 5)							
1-7. Gün	22.551 ^b	± 0.618	26.420 ^a	± 0.519	26.609 ^a	± 0.603	0.000
7-14. Gün	31.242 ^b	± 0.905	34.754 ^a	± 0.778	36.523 ^a	± 0.963	0.000
14-21. Gün	42.932	± 1.197	39.570	± 1.262	39.374	± 1.383	0.099
21-28. Gün	43.866	± 1.552	44.931	± 1.704	42.428	± 1.374	0.509
28-35. Gün	20.640	± 2.342	21.596	± 2.164	23.064	± 2.320	0.751
35-42. Gün	18.73	± 2.760	18.13	± 3.151	19.953	± 3.171	0.909
0-42. Gün	179.419 ^b	± 2.029	183.943 ^{ab}	± 2.605	187.945 ^a	± 2.458	0.046
Yem tüketimi (g) (n=5)							
1-7. Gün	73.298	± 3.869	80.238	± 7.493	65.575	± 1.951	0.159
7-14. Gün	88.464	± 4.322	93.421	± 0.928	94.165	± 2.411	0.353
14-21. Gün	101.787	± 2.833	98.767	± 0.697	100.188	± 0.619	0.485
21-28. Gün	155.132	± 5.349	157.024	± 5.0744	147.838	± 3.128	0.364
28-35. Gün	174.336	± 4.990	175.089	± 2.004	168.088	± 3.894	0.395
35-42. Gün	187.291	± 12.786	181.821	± 8.428	158.712	± 3.301	0.100
0-42. Gün	781.211 ^a	± 18.166	786.121 ^a	± 14.433	734.626 ^b	± 6.534	0.041
Yemden yararlanma (g/g) (n=5)							
1-7. Gün	3.285	± 0.252	3.034	± 0.274	2.467	± 0.711	0.057
7-14. Gün	2.436	± 0.118	2.308	± 0.058	2.211	± 0.054	0.190
14-21. Gün	2.717	± 0.106	2.855	± 0.022	2.914	± 0.059	0.178
21-28. Gün	3.539	± 0.126	3.494	± 0.063	3.498	± 0.137	0.953
28-35. Gün	8.477	± 0.388	8.168	± 0.370	7.412	± 0.501	0.229
35-42. Gün	10.402	± 1.320	10.183	± 0.825	8.095	± 0.483	0.202
0-42. Gün	4.532 ^b	± 0.132	4.442 ^b	± 0.074	4.051 ^a	± 0.014	0.005

^{ab}: Aynı satırda değişik harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05, P<0.01, P<0.001). Değerler, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.

Tablo 6. Bildircin rasyonuna biberiye ve rezene uçucu yağ karması ilavesinin farklı depolama (+4 °C) zamanlarında et MDA düzeyi üzerine olan etkileri**Table 6.** Effects of rosemary and fennel essential oil addition on quail ration, on meat MDA level at different storage time (+4 °C)

	Kontrol			Grup I			Grup II			P değeri
Biberiye UY (mg/kg)	0			100			200			
Rezene UY (mg/kg)	0			100			200			
1. Gün	0.068	±	0.012	0.052	±	0.007	0.069	±	0.008	0.089
7. Gün	1.000	±	0.027	0.946	±	0.051	0.832	±	0.093	0.175
15. Gün	1.205 ^a	±	0.010	1.002 ^b	±	0.031	0.946 ^b	±	0.076	0.002

^{a,b,c} Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (P< 0.01).

UY: Uçucu yağ; Değerler, ortalama ± standart sapma şeklinde ifade edildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada biberiye ve rezene uçucu yağ karışımlarının bildircinlerin performans ve et kalite parametreleri (renk, pH, MDA düzeyi) üzerine etkilerinin oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. Uçucu yağlar genellikle 1'den daha düşük özgül ağırlık değerlerine sahiptirler. Bu çalışmada kullanılan biberiye uçucu yağının özgül ağırlığı 0.895 g/ml, rezene uçucu yağının ise 0.961 g/ml olarak belirlendi (Tablo 3). Araştırmada kullanılan biberiye ve rezene uçucu yağlarının aktif bileşenleri incelendiğinde biberiye uçucu yağının önemli bir bölümünün "α-pinen" ve "terpinene" den rezene uçucu yağının ise "trans-anethole" ve "fenchone" dan oluştuğu görülmektedir (Tablo 2). Bu uçucu yağların kullanıldığı diğer araştırmalar incelendiğinde benzer etken maddelerden oluştukları ancak oranlarının farklılık gösterdiği görülmüştür. Çetin ve ark. (2017) araştırmalarında kullandıkları biberiye uçucu yağının önemli bir bölümünün 1,8-cineol (%51.63) den oluştuğunu bildirmişlerdir. Rezene uçucu yağıyla yapılan çalışmalarda ise ana etken maddesinin "trans-anethole"den oluştuğu ve düzeyinin %38-82 arasında değiştiği belirtilmiştir (Gulfraz ve ark. 2008; Zoubiri ve ark. 2014). Bu farklılıklara bitkinin yetiştiği iklim, toprağın yapısı, hasat edildiği dönem, bitkinin denize yakınlığı ve uzaklığı, uçucu yağların ekstraksiyon metodu gibi faktörlerin neden olduğu söylenebilir. Ayrıca, kullanılan uçucu yağların, aynı tür bitkilerden elde edilmiş olsalar bile genotipik özelliklerinin ve elde edilmiş yöntemlerinin farklı olması, uçucu yağın elde edilmesinde bitkinin hangi kısmının kullanıldığı ve bu kısmın dövülmüş ya da dövülmemiş olmasının da farklılıklara neden olabileceği bildirilmektedir (Hammer ve ark. 1999).

Bu araştırmada bildircin rasyonlarına 200 mg/kg düzeyinde biberiye ve rezene UYK ilavesi, performans parametrelerinden canlı ağırlık kazancı, yem tüketimi bakımından kontrol grubuna göre, yemden yararlanma oranı bakımından ise hem kontrol ve hem de I. gruba göre önemli düzeyde iyileşmelere neden olmuştur.

Uçucu yağların kullanıldığı bilimsel çalışmalar incelendiğinde rasyona aromatik bitki ve ekstraktlarının tek başlarına ve kombine ilavelerinin performans parametrelerinde farklı sonuçlara neden olduğu görülmüştür.

Alçiçek ve ark. (2003) kekik, defne yaprağı, adaçayı, mersin yaprağı, rezene tohumu ve turuncgil uçucu yağ karışımlarından oluşan kombinasyonu etlik piliç rasyonlarında kullanmışlardır. Deneme sonunda 48 ve 72 mg/kg esansiyel yağ kombinasyonu eklenen grupların en

iyi yemden yararlanma oranına sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Mahmud (2014) ise farklı düzeylerde rezene tohumu (0.25, 0.50 ve 0.75 g/kg) içeren rasyonlarla beslenen Japon bildircinlerinde canlı ağırlığın önemli ölçüde arttığını, 0.50 g/kg rezene tohumu kullanımıyla yemden yararlanma oranının önemli düzeyde iyileştiğini ifade etmiştir. Williams ve Rosa (2002) etlik piliç rasyonlarına uçucu yağ katkısının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda, uçucu yağ ilave edilmesinin etlik piliçlerin sindirim sistemindeki besinlerin vizkozitesini düşürerek yapışkan dışkı atılımını ve sindirim sistemindeki *Clostridium perfringens*'in kolonizasyonunu azalttığını ve bunun neticesinde yemden yararlanmanın iyileştiğini ve günlük canlı ağırlık artışının yükseldiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar (Tollba 2003; Jamroz ve ark. 2003) uçucu yağların yararlı etkilerinin, yem tüketimini artırmaları, endojen sindirim enzimlerinin salgılanmasını uyarmaları, bağışıklığı harekete geçirmeleri, antibakteriyel, antiviral, antioksidan ve antihelmintik etkileriyle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Buna karşın, Basmacıoğlu ve ark. (2004) biberiye ve kekik uçucu yağlarını kullanarak yaptıkları çalışmaları sonucunda canlı ağırlık, yem tüketimi ve yemden yararlanma üzerine önemli düzeyde etkilerinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Lee ve ark. (2003) etlik piliç rasyonlarına eklenen timol ve karvakrolün etlik piliçlerde, Papageorgiou ve ark. (2003) ise biberiye uçucu yağının, hindilerin büyüme performansı üzerine etkileri olmadığı sonucuna varmışlardır.

Araştırma sonuçları arasındaki bu farklılıklar kullanılan bitkisel uçucu yağın çeşidine, yapısındaki etken maddelerin bileşimine, rasyona ilave edilme düzeyine, yemin depolanma koşullarına ve rasyonun bileşimine bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca uçucu yağlar tek başına etkili olabildikleri gibi birlikte kullanıldıklarında da sinerjik veya antagonist etki gösterebilmektedirler (Evren ve Tekgüler 2011). Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistik değerlendirmeleri sonucunda biberiye ve rezene uçucu yağlarının birlikte kullanımının performansı iyileştirdiği kanısına varılmıştır.

Tablo 5'te de görüldüğü gibi rasyona 100 ve 200 mg/kg düzeyinde biberiye ve rezene uçucu yağ ilavesi gruplar arasında ortalama kesim öncesi ağırlıkları, sıcak ve soğuk karkas ağırlıkları bakımından farklılık oluşturmamıştır. Benzer şekilde karkas randımanı ile but ve göğüs pH değerleri açısından da istatistiki önemde bir farklılık bulunmamıştır (P>0.05).

Yapılan birçok bilimsel çalışmada rasyona uçucu yağ ilavesinin karkas parametrelerinde artışa neden olduğu (Mahmud 2014; Penga ve ark. 2016; Yeşilbağ ve ark. 2014) bildirilmesine rağmen etkili olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Alp ve ark. 2012; Basmacıoğlu ve ark. 2004; Ocak ve ark. 2006). Uçucu yağların kanatlı eti pH sı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma (Harmanakaya ve Vatasever 2017; Kırkpınar ve ark. 2014; Symeon ve ark. 2009) incelendiğinde pH değerleri arasında önemli bir fark saptanmadığı görülmüştür. Buna karşın Yeşilbağ ve ark. (2011) rasyonlarına biberiye bitkisi ekledikleri etlik piliçlerin göğüs ve but eti pH'larının önemli düzeyde düştüğünü bildirmişlerdir. Farklı aromatik bitkilerden elde edilen ekstrakt ürünlerinden beklenen etkilerin tam olarak alınabilmesi için bitkiye uygulanacak ekstraksiyon yöntemi ve bu yöntemde kullanılacak uygun çözücünün seçimi büyük önem taşımaktadır. Bu durum aromatik bitki ekstraktları ile yapılan birçok bilimsel çalışmada farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir.

Bıldırcın but etlerinin renk kriterlerine ait ortalama L*, a*, b* değerleri ve istatistik analiz sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. Burada L* parlaklık, a* kırmızılık ve b* de sarı renk ölçüsü olarak ifade edilmektedir. Renk değişim faktörlerinden en fazla etkilenen et çeşidinin göğüs eti olduğu bildirilmiştir (Işık, 2008). Bu nedenle çalışmada etin renk bakımından değerlendirilmesinde göğüs eti tercih edilmiştir. Bu çalışmada L* renk kriteri bakımından II. grup en yüksek L* değeri göstermiş olup, diğer gruplara göre daha açık renkli göğüs eti elde edilmesine neden olmuştur. L* değerlerinin daha açık renkte olması, tüketici kabulü açısından daha fazla talep oluşturmasına sebep olabilir. Et rengi büyük ölçüde; myogloblin konsantrasyonu ve kısmen de hemoglobin gibi pigmentlerin ortamda mevcudiyetine bağlıdır. Kanatlı etlerinde renk bozulması, etin içerdiği bu pigmentlerin miktarıyla ilişkilendirilebilir. Pigmentlerin kimyasal yapısı ve sonuçta etin üzerine düşen ışığı yansıtır orani değişir. Diğer taraftan lipid oksidasyonu ürünleri myogloblin oksidasyonu oranını artırarak kırmızılığı, yani a* değerini düşürmektedir (Chan ve ark. 1997). Bu çalışmada göğüs etinde tespit edilen TBARS değerleri (Tablo 5) ile kırmızılığı ifade eden a* değerleri arasında da bu ilişki tespit edilmiştir. Yani diğer iki gruba göre önemli düzeyde yüksek a* değerine sahip olan II. grubun TBARS değeri istatistiksel anlamda düşüş göstermiştir.

Kanatlı etleri yüksek çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olmaları nedeniyle oksidatif bozulmaya oldukça duyarlıdır. TBARS, lipid oksidasyonunun bir göstergesi olarak, etteki MDA miktarının belirlendiği bir yöntemdir. Bu çalışmada, TBARS değerleri üzerine uçucu yağların etkisi önemli bulunmuştur. Özellikle depolama süresi uzadıkça bu etkisini daha iyi ortaya koyabilmiş ve doz artışına bağlı olarak antioksidan etkileri daha da artmıştır. Birçok araştırmacı (Shahat ve ark. 2011; Robya ve ark. 2013; Gende ve ark. 2009) içerdiği yüksek düzeydeki *trans*-anethole nedeniyle rezene uçucu yağının hem antioksidan hem de antimikrobiyal etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Skerget ve ark. (2005) ise uçucu yağların yapısında bulunan fenollerin antioksidan etkilerinin hücre membranı üzerindeki spesifik antioksidan etkilerinden ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyici özelliklerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, yem katkısı olarak kullanılan biberiye ve adaçayı ekstraktlarının broyler etlerinde yağ oksidasyonuna karşı etkin oldukları, antioksidan etkilerinin karotenoid ve flavonoidlerden kaynaklandığı, E vitamininde bulunan tokoferoller kadar

hücre ve dokuları korumada etkin oldukları belirlenmiştir (Kamel 2000).

Sonuç olarak, sağlıklı ve dengeli bir yaşamın sürdürülebilmesi için tüketilen besin maddelerinin güvenilir olması ve sağlık açısından hiçbir risk taşıması gerekmektedir. İnsanların tüketimine sunulan hayvansal ürünlerin sofraya gelinceye kadar her türlü denetim aşamalarından güvenle geçmesi beklenmektedir. Dolayısıyla insanların beslenmesinde temel protein kaynaklarından birisini oluşturan kanatlı etlerinin de sağlık açısından risk taşıması gerekir. Bu araştırmanın sonuçlarına dayanarak biberiye ve rezene uçucu yağ karışımlarının bıldırcın rasyonlarında kullanımıyla elde edilen hayvansal ürünlerin raf ömrünün uzatılması yönünde kullanım potansiyellerinin bulunduğu kanısına varılmıştır. Diğer yandan doğal uçucu yağların eski çağlardan beri yararlı etkileri bilinmekle beraber hayvan beslemedeki etki mekanizmalarının tam olarak açıklığa kavuşturulmuş söylemek mümkün değildir. Rasyonlarda kullanılan uçucu yağların kimyasal bileşimleri, birbirleriyle olan etkileşimleri, maksimum kullanım düzeyleri, karma yemlere katılma teknolojileri, aktivite süreleri, canlı organizma ve ürünlerine olan etkileri konusunda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alçiçek A, Bozkurt M, Çabuk M (2003).** The effect an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. *S Afr J Anim Sci*, 33, 89-94.
- Alp M, Midilli M., Kocabagli N, Yilmaz H, Turan N, Gargili A, Acar N (2012).** The effects of dietary oregano essential oil on live performance, carcass yield, serum immunoglobulin G level, and oocyst count in broilers. *J Appl Poult Res*, 21, 630-636.
- AOAC (2000).** Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. AOAC Int., Maryland.
- Basmacıoğlu H, Tokuşoğlu Ö, Ergül M (2004).** The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. *South Afr Soc Anim Sci*, 34, 197-210.
- Botsoglou NA, Govaris A, Botsoglou EN, Grigoropoulou SH, Papageorgiou G (2003).** Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopherylacetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *J Agric Food Chem*, 51(10), 2930-2936.
- Carpenter KJ, Clegg KM (1956).** The metabolizable energy of poultry feedingstuffs in relation to their chemical composition. *J Sci Food Agric*, 7, 45-51.
- Cengiz ŞŞ, Yeşilbağ D, Eren M, Çetin İ, Meral Y, Biricik H (2016).** Effects of volatile oil additives on growth, carcass performances, and calcium and phosphorus concentrations in serum and bone of broilers. *Revue Méd. Vét.*, 167, 230-239.
- Chan WKM, Faustman C, Decker AE (1997).** Oxymyoglobin oxidation as affected by oxidation products of phosphatidylcholine liposomes. *J Food Sci*, 62, 709-712.
- Christaki EV, Bonos EM, Florou-Paneri PC (2011).** Laboratory of nutrition comparative evaluation of dietary oregano, anise and olive leaves in laying Japanese quails. *Braz J Poult Sci*, 13, 97-101.
- Çabuk M, Alçiçek A, Bozkurt M, İmre N (2003).** Aromatik bitkilerden elde edilen esans yağların antimikrobiyel özellikleri ve alternatif yem katkı maddesi olarak kullanım imkânı. *II. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi*, 184-187.
- Çabuk M, Eratak S, Alçiçek A, Tuğlu I (2014).** Effect of Herbal Essential Oil mixture on Intestinal Mucosal Development, Growth Performance, and Weights of Internal Organs of Quails. *J Essent Oil Bear Pl*, 17 (4), 599-606.
- Çetin İ, Yeşilbağ D, Cengiz ŞŞ, Belenli D (2017).** Effects of Supplementation with Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Volatile Oil on Growth Performance, Meat MDA Level and Selected Plasma Antioxidant Parameters in Quail Diets. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23 (2), 283-288.
- Çiftçi M, Şimşek ÜG, Azman MA, Çerçi İH, Tonbak F (2013).** The Effects of Dietary Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Oil Supplementation on Performance, Carcass Traits and Some Blood Parameters of Japanese Quail Under Heat Stressed Condition. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (4), 595-599.

- Çiftçiöğlü G (2015).** Kanatlı Etleri Hijyeni ve Teknolojisi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Ders Notu. 1-13.
- Düzgüneş O (1963).** İstatistik Prensipleri ve Metotları, Ege Üniv. Matbaası, VIII. Baskı, İzmir.
- Estevez M, Ramirez R, Ventanas S, Cava R (2007).** Sage and rosemary essential oil versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. *Food Sci Tech*, 40, 58-65.
- Evren M, Tekgüler B (2011).** Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. *El Mikr Derg*, 9 (3), 28-40.
- Florou-Paneri P, Palatos G, Govaris A, Botsoglou D, Giannenas I, Ambrosiadis I (2005).** Oregano herb versus oregano essential oil as feed supplements to increase the oxidative stability of turkey meat. *Int J Poultry Sci*, 4 (11), 866-871.
- Gende LB, Maggi MD, Fritz R, Eguaras MJ, Bailac PN, Ponzi MI (2009).** Antimicrobial activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against *Paenibacillus* larvae. *J Essent Oil Res*, 21, 91-93.
- Gulfraz M, Mehmood S, Minhas N, Jabeen N, Kausar R, Jabeen K, Arshad G (2008).** Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *African J Biotech*, 7 (24), 4364-4368.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*, 86, 985-990.
- Harmankaya S, Vatansver L (2017).** The Effect of Essential Oils of Rosemary and Clove on Shelf Life Chicken Meat. *Van Vet J*, 28 (1), 11-19.
- Hernandez F, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megis MD (2004).** Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci*, 83, 169-74.
- Hunt MC, Acton JC, Benedict RC, Calkins CR, Cornforth DP, Jeremiah LE, Olson DP, Salm CP, Savell JW, Shivas SD (1991).** Guidelines for meat color evaluation. American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board, Chicago, USA, 191, 1-12.
- İşık Ş (2008).** Farklı broyler hibritlerinin verim ve et Kalitesi özellikleri bakımından Karşılaştırılması, T.C. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Jamroz D, Orda J, Kamel C, Wiliczekiewicz A, Wertelecki T, Skorupinska J (2003).** The influence of phytogetic extract on performance, nutrients digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. *J Anim Feed Sci*, 12, 583-596.
- Kamel C (2000).** A Novel Look at a Classic Approach of Plant Extracts. *Feed Mix*, 8 (3), 16-18.
- Kırkpınar P, Ünlü HB, Serdaroğlu M, Turp GY (2014).** Effects of dietary oregano and garlic essential oils on carcass characteristics, meat composition, colour, pH and sensory quality of broiler meat. *Br Poult Sci*, 55 (2), 157-166.
- Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Yeom KH, Beynen AC (2003).** Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *J Appl Poult Res*, 12, 394-399.
- Mahmud HA (2014).** Response of growing japanese quail to different levels of fennel seeds meal. *Egypt Poult Sci*, 34 (3), 795-807.
- Namiki, M (1990).** Antioxidants/Antimutagens in Food. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr*, 29, 273-300.
- Ocak N, Erener G, Ak FB, Sungu M, Altop A, Özmen A (2006).** Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. *Czech J Anim Sci*, 53 (4), 169-175.
- Pala-Paul J, García-Jiménez R, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Sanz J (2004).** Essential oil composition of the leaves and stems of *Meum athamanticum* Jacq., from Spain. *J of Chromatography A*, 1036, 245-247.
- Papageorgiou G, Botsoglou N, Govaris A, Giannenas I, Iliadis S, Botsoglou E (2003).** Effect of dietary oregano oil and α -tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 87, 324-335.
- Penga QY, Li JD, Li Z, Duan ZY, Wua YP (2016).** Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech*, 214, 148-153.
- Ragab MS (2007).** Effects of using fennel seeds in growing Japanese quail diets varying in their protein content with or without enzyme supplementation. *Fayoum J Agric Res Dev*, 21, 113-36.
- Robya MHH, Sarhana MA, Selima KAH, Khalela KI (2013).** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Indust Crops and Prod*, 44, 437-445.
- Sarıca M, Camcı Ö, Selçuk E (1998).** Bildirgin, Sülün, Keklik, Etçi Güvercin ve Devekuşu Yetiştiriciliği. *O.M.Ü. Ziraat Fak. Ders Kitabı*, No:10, Samsun.
- Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA (2011).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules*, 16, 1366-1377.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 89, 191-198.
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V (1995).** Biyoistatistik. Özdemir Yayıncılık, 6. Baskı, Ankara.
- Symeon GK, Zintilas C, Ayoutanti A, Bizelis JA, Deligeorgis SG (2009).** Effect of dietary oregano essential oil supplementation for an extensive fattening period on growth performance and breast meat quality of female medium-growing broilers. *Can J Anim Sci*, 89, 331-334.
- Şındak N, Akgül Mb, Gülaydın A, Karakoç Z (2017).** Effects of Topical Terebinth Berry Oil and Different Experimental Mixtures on Wound Healing in Japanese Quails (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Van Vet J*, 28 (2) 69-74.
- Tang SZ, Kerry JP, Sheehan D, Buckley DJ Morrissey PA (2001).** Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long-term frozen stored chicken meat. *Meat Sci*, 57, 331-376.
- Tollba AA (2003).** Using some natural additives to improve physiological and productive performance of broiler chicks under high temperature conditions. 1-Thyme (*Thymus vulgaris* L.) or fennel (*Foeniculum vulgare* L.). *Egypt Poult Sci*, 23, 313-326.
- Türk G, Çeribaşı AO, Şimşek ÜG, Çeribaşı S, Güvenç M, Özer Kaya Ş, Çiftçi M, Sönmez M, Yüce A, Bayrakdar A, Yaman M, Tonbak F (2016).** Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. *Anim Reprod Sci*, 164,133-143
- Williams P, Losa R (2002).** Blending essential oils for poultry. *Feed-Mix*, 10 (3), 8-9.
- Ould SMY, Azeroual E, Kribii A, El Ouardi A, Benazzouz B, Ouichou A, EL HessniA, Akhouayri O, Mesfioui A (2015).** Chemical. Composition and Zootechnical Effects of Essential Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) and Anise (*Pimpinella anisum* L.) on Turkey. J. World's and Mesfioui Abdelhalim Chemical Composition and Zootechnical Effects of Essential Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Anise (*Pimpinella anisum* L.) on Turkey. *J World's Poult Res*, 5(4), 90-97.
- Yesilbag D, Eren M, Ağel HE, Kovanlıkaya A, Balcı F (2011).** Effects of Dietary Rosemary, Rosemary Volatile Oil and Vitamin E on Broiler Performance, Meat Quality and Serum SOD Activity. *Br Poult Sci*, 22(9), 472-482.
- Yeşilbağ D, Cengiz ŞŞ, Cetin İ, Meral Y, Biricik H (2014).** Influence of Juniper (*Juniperus communis*) oil on growth performance and meat quality as a natural antioxidant in quail diets. *Br Poult Sci*, 55 (4), 495-500.
- Zoubiri S, Baaliouamer A, Seba N, Chamouni N (2014).** Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arab J Chem*, 7, 480-485.



Relationships Between Hepsidin Levels in Some Hematological and Biochemical Parameters in Sheep With Natural Babesiosis

Özlem ORUNÇ KILINÇ¹ Yıldray BAŞBUĞAN² Nazmi YÜKSEK² Türker ATCALI³

¹ Van Yuzuncu Yil University, Ozalp Vocational School, Van-Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, Van, Turkey

³ Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, Burdur, Turkey

Received: 08.02.018

Accepted: 12.04.2018

SUMMARY

This study was conducted to determine the relationship between hematocrit levels and some hematological and biochemical parameters after hemolysis of erythrocytes in natural babesiosis sheep. A total of 40 sheep were included in the study, 20 healthy (control group) and 20 natural babesiosis. Blood samples were taken from the vena jugular of 20 sheep with clinical findings in Biochemistry tube and blood tube with EDTA. DNA extraction was performed in accordance with the procedure with GeneJetViral DNA (Thermo Scientific, Catalog number: K0821) kit. PCR was performed using a pair of primers specific for the 18S ribosomal RNA gene region for the detection of Babesia agents. The amplified gene regions were stained with ethidium bromide on a 1% agarose gel and detected under UV light on a gel imager. According to the PCR result, 425 bp positivity was determined. Whole hemograms were performed from the blood taken from EDTA tubes. Serum was taken from the blood taken from the biochemistry tube and frozen at -20 until analysis day. Serum levels of heparin, serum iron and iron binding parameters were measured. In this study, it was observed that the values of RBC, HTC ($p < 0,001$), HGB ($p < 0,05$) values decreased in sheep with babesiosis compared to the control group. There was a decrease in neutrophil counts ($p < 0,05$) compared to the control group, and an increase in lymphocyte, monocyte and basophil percentage ($p < 0,05$). There was also a significant decrease in PLT numbers ($p < 0,05$). Serum Fe levels were increased ($p > 0,05$), although statistical significance was not significant compared to the control group. In this study, hepsidine levels in babesia group were statistically higher than control ($p < 0,05$). As a result, in sheep with babesiosis, it was concluded that the decrease in erythrocyte parameters, the development of stress leukogram, the increase in iron parameters and hepsidine levels, and it was concluded that these results may be diagnostic.

Key Words: Babesia, Hepsidine, Iron, Sheep

ÖZET

Doğal Babesiosis'li Koyunlarda Hepsidin Düzeyleri ile Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Arasındaki İlişkiler

Bu çalışma doğal babesiosisli koyunlarda eritrositlerin hemolizi sonrası hepsidin düzeyleri ile hematolojik ve biyokimyasal bazı parametreler arasında nasıl bir ilişkinin olduğunu belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmaya 20 sağlıklı (Kontrol grubu), 20 doğal babesiosisli olmak üzere toplam 40 koyun dahil edildi. Klinik bulgulara sahip 20 koyunun vena jugularisinden biyokimya ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. DNA ekstraksiyonu GeneJETViral DNA (ThermoScientific, catalognumber: K0821) kiti ile prosedüre uygun olarak yapıldı. Babesia etkenlerinin tespiti için 18S ribozomal RNA gen bölgesine spesifik olan bir çift primer kullanılarak PCR yapıldı. Ampilifiye edilen gen bölgeleri %1'lik agaroz jelde ethidiumbromid ile boyanarak jel görüntüleme cihazında UV ışık altında belirlendi. Yapılan PCR sonucuna göre ise 425 bp pozitiflik belirlendi. EDTA'lı tüplere alınan kanlardan tam hemogram bakıldı. Biyokimya tüpüne alınan kanlardan serum elde edilerek analiz gününe kadar -20 de donduruldu. Analiz günü çözündürülen serumlardan hepsidin, serum demir seviyesi ve demir bağlama parametreleri ölçüldü. Bu çalışmada babesiosisli koyunlarda kontrol grubu ile kıyaslandığında RBC, HTC ($p < 0,001$), HGB ($p < 0,05$) değerlerinin istatistiki azaldığı görüldü. Nötrofil değerlerinde kontrol grubuna göre azalma ($p < 0,05$) meydana gelirken, lenfosit, monosit ve bazofil yüzdesinde ise artış ($p < 0,05$) görüldü. Ayrıca PLT sayılarında önemli oranda ($p < 0,05$) azalma belirlendi. Serum Fe seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiki önem olmamasına rağmen artış ($p > 0,05$) görüldü. Bu çalışmada hepsidin seviyeleri babesia grubunda kontrole göre istatistiki olarak yüksek ($p < 0,05$) olduğu belirlendi. Babesiosisli koyunlarda eritrosit parametrelerinde azalma, stres lökogramının geliştiği, demir parametrelerinde ve hepsidin seviyelerinde artmaların olduğu ve diagnostik öneminin olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Babesia, Hepsidin, Demir, Koyun

GİRİŞ

Babesia türleri ixodid keneler ile transtadial ve transovarial olarak nakledilen eritrositleri enfekte eden

protozoonlardır. Tüm dünyada en sık görülen türler *B. ovis* ve *B. motasi*'dir. (Çiçek ve ark., 2004, Kılınç ve ark., 2015, Sevinç ve ark., 2015). Babesia türleri tropical ve subtropical bölgelerde koyun ve keçilerde ölümlere sebep

olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açar. Babesiosis ülkemizde de tüm bölgelerde özellikle koyunlarda mevsimsel bir hastalık olarak görülür. Babesiosisin klasik belirtisi yüksek ateşle seyreden anemi ve hemoglobüridir. Tedavi edilmeyen hayvanlarda şok tablosu gelişir ve renal yetmezlik sonucu ölümler görülür. (Yur ve ark., 2010, Esmailnejad ve ark., 2012).

Babesiosis de aneminin gelişmesine çeşitli faktörler sebep olur. Bunlardan ilki etkenlerin eritrositleri istila ederek hemolizine yol açması ve bunun sonucunda anemi oluşmasıdır. Ayrıca hastalık sırasında artmış lipit peroksidasyonu ve oksidatif stres faktörleri nedeni ile hemolitik aneminin oluşabileceği öne sürülmektedir. Etkenlerin eritrositleri enfekte etmesi hematopoiesise zarar vererek kandaki eritrosit sayısını ve hemoglobin miktarında düşürdüğü bildirilmektedir. Azalmış eritrosit sayısı vücutta oksijen transportunu azaltarak hipoksiye ve hemodinamik ve nonhemodinamik olaylara sebep olur (Esmailnejad ve ark., 2012, Kılınc ve ark., 2015)

Hepsidin, demir metabolizmasında anahtar rol oynadığı tespit edilen, hepatositlerde üretilen, 25 aminoasitten oluşan, antibakteriyel bir peptiddir (Çelik 2005). Yüksek oranda disülfid bağıyla korunmuş bir hormondur (Badial ve ark., 2011).

Başol ve ark. (2007) göre hepsidin; barsaklardan demir emiliminin, makrofajlardaki demir döngüsünün ve hepatik depolardan demir salınımının hemostatik düzenleyicisi olarak tanımlanır. Hepsidin, transmembran yerleşimli bir protein olan ferroportin ile etkileşime geçerek hücrel demir salınımını düzenlemektedir. Demir depoları yeterli ve yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır. Böylece ince barsakta demirin enterositlerden plazmaya taşıyan yol bloke edilir. Hipoksi ve demir depolarının düşük olduğu anemide ise, hepsidin üretimi azalır (Rossi, 2005).

Yapılan çalışmalarda Babesiosisli hayvanlarda tam kanda eritrosit, hemoglobin, hematokrit değerlerinin azalmış olduğu anemi tablosunun şiddetli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca serum demir, bakır ve çinko düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla azalmış olduğu tespit edilmiştir (Chaudhuri ve ark., 2008, Furlanello ve ark., 2005)

Bu çalışma; doğal babesiosisli koyunlarda eritrositlerin hemolizi sonrası hepsidinin nasıl bir davranış sergileyeceği, hepsidin düzeyleri ile hematolojik ve biyokimyasal bazı parametreler arasında nasıl bir ilişkinin olduğunu belirlemek için yapıldı. Yapılan literatür taramalarında Babesiosisli koyunlarda hepsidin düzeyleri üzerine herhangi bir bilimsel veriye rastlanmaması bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali:

Bu çalışmanın materyalini klinik ve laboratuvar bulgularıyla teşhis edilmiş doğal olarak infekte 20 adet babesiosisli koyun ile 20 adet sağlıklı koyun olmak üzere toplam 40 koyun oluşturdu. Hastalık şikayeti ile gelen hayvan sahiplerinin işletmelerine gidilerek tanı amacıyla her bir hayvanın Vena jugularisinden usulüne uygun olarak hematoloji ve 1 biyokimya tüpüne kan alındı. Yapılan froti sonucuna göre etken belirlenen hayvanlar çalışmaya dahil edildi. Hastalık tespit edilen hayvanlara derhal tedavi prosedürü uygulandı. Pozitif olan hayvanların serumları ependorf tüplerine alınarak ve depfreezde (-20 °C) çalışma yapılncaya kadar muhafaza edildi.

Laboratuvar muayeneleri

Hematolojik Parametreler

Hematolojik muayeneler için alınan kan örneklerinde Red Blood Cell (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematokrit (HTC), White Blood Cell (WBC), Lenfosit (Len), Monosit (Mon), Nötrofil (Nöt), Eozonofil (Eoz), Bazofil (Baz), Platelet (PLT), veteriner kan sayım cihazı (Abacus - Junior Vet5®) ile belirlendi.

Biyokimyasal parametreler

Serum hepsidin seviyeleri hepsidin (Bovine Hepsidin 25® Cusabio®) kiti ile ELISA cihazında (ELISA reader® -DAS) ölçüldü. Demir (Fe), Demir bağlama kapasitesi (DBK) ve Total demir bağlama kapasitesi (TDBK) seviyeleri biyokimya cihazı (Abbot C16200®) ile belirlendi.

DNA ekstraksiyonu ve PCR

Kan örneklerinin DNA ekstraksiyonu GeneJET Viral DNA and RNA purification kiti (ThermoScientific, catalognumber: K0821) ile kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Elde edilen DNA'lardan nükleik asit amplifikasyonu için 18S rRNA gen bölgesine spesifik olan BJ1 5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGG-3' ve BN2 5'-TAGTTTATGGTTAGGACTACG-3' primerleri ile PCR analizi yapıldı (Schorn ve ark., 2011). Total 50 µl PCR reaksiyon mixi oluşturuldu ve bunun içindeki DNA miktarı 5 µl, 75 mM Tris-HCl (pH8.8), 20 mM NH₄(SO₄)₂, 1.5 mM of MgCl₂, primerler 10 pmol, 0.2 mM of dNTP ve Taq DNA polymerase ise 0.5 U (MBI, Fermentas, Lithuania) olacak şekilde hazırlandı. Isı döngü cihazında 94 °C'de 5 dakika denatürasyon aşamasını takiben 94°C'de 30 saniye 55 °C'de 30 saniye ve 72°C'de 40 saniye ısı döngüleri uygulandı ve bu ısı programı 40 siklus tekrarlandı. 72°C'de 10 dakika süren final extensiyonundan sonra 425 baz çifti büyüklüğünde DNA ürünü elde edildi. Değerlendirme amacıyla 100 bp'lik standart kullanıldı ve amplifiye olan DNA ürünleri %1'lik agaroz jelde ethidiumbromid ile boyanarak jel görüntüleme cihazında UV ışık altında belirlendi.

İstatistik Analizi

Çalışmada kontrol grubu ile babesiosisli gruptan elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma değerler olarak ifade edildi. Gruplar arasında Student's t testi kullanıldı. Ayrıca babesiosisli grupta parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak değerlendirildi. Hesaplamalar için SPSS (20) istatistik paket programı kullanıldı.

BULGULAR

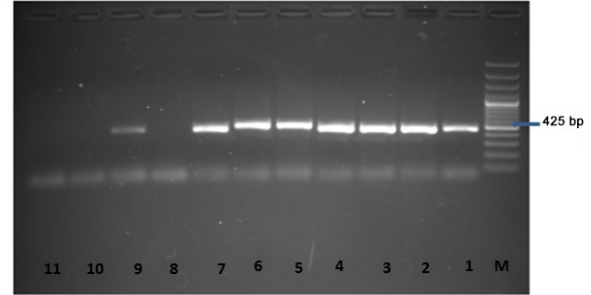
Çalışmaya dahil edilen koyunlarda klinik olarak yüksek ateş (40 °C), hemoglobüri, anemi ile birlikte kalp ve solunum frekansında artış tespit edildi. Hasta hayvanlardan alınan örneklerden yapılan PCR sonucuna göre ise 425 bp pozitiflik belirlendi (Şekil. 1).

Kontrol grubuna göre babesiosisli grupta RBC ve HTC istatistik olarak önemli oranda (P<0,001), HGB, Neutrofil, PLT ve Fe-DBK (P<0,05) azalırken, Hepsidin Lenfosit, Monosit, Bazofil değerlerinde de artış (P<0,05) belirlendi (Tablo1-2).

Tablo 1. Kontrol grubu ile babesiozisli grubun hematolojik ve biyokimyasal parametreleri**Table 1.** The haematological and biochemical parameters of the control group and the babesia group.

Parametreler	Kontrol (n=20)	Babesiozis (n=20)
RBC (10 ⁶ /μL)	4.94±0.24	3.06±0.15**
HGB (g/dl)	10.29±0.19	8.79±0.44*
HCT (%)	28.57±0.67	19.23±1.29**
WBC (10 ³ /μL)	7.50±0.76	11.05±1.53
Neutrofil (%)	35.77±3.05	11.35±2.50*
Lenfosit (%)	60.90±2.14	75.08±3.40*
Monosit (%)	1.65±0.34	3.98±0.88*
Eozinofil (%)	1.50±1.31	2.27±1.64
Bazofil (%)	0.18±0.13	7.52±5.00*
PLT (10 ³ /μL)	415.20±14.16	242.08±90.16*
Fe (μg/dL)	125.00±13.48	174.95±24.46
TDBK (μg/dL)	312.72±19.47	320.83±24.59
DBK (μg/dL)	195.83±22.83	171.11±14.50*
Hepsidin (ng/ml)	32.22±8.94	74.16±16.07*

*P<0.05, **P<0.001 aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemi gösterir; TDBK (Total Demir Bağlama Kapasitesi), DBK (Demir Bağlamama Kapasitesi)

**Şekil 1.** PCR testi sonucunun agaroz jel görüntüsü**Figure 1.** Agarose gel image of result of PCR test

[M: DNA marker, 1,2,3,4,5,6,7,9: pozitif örnekler, 8,10,11: negatif örnekler]

Tablo 2. Hepsidin seviyeleri ile bazı parametreler arasındaki ilişkileri**Table 2.** Relations between hepcidin levels and some parameters

	Hepsidin (ng/ml)	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dl)	HCT (%)	Fe (μg/dL)	Fe-TIBC (μg/dL)	Fe-UIBC (μg/dL)
Hepsidin (ng/ml)	1						
RBC (10 ⁶ /μL)	0.138	1					
HGB (g/dl)	0.096	0.751**	1				
HCT (%)	0.472	0.716*	1.000**	1			
Fe (μg/dL)	-0.347	-0.350	-0.447*	-0.369	1		
Fe-TIBC (μg/dL)	-0.319	-0.272	0.121	-0.130	0.667**	1	
Fe-UIBC (μg/dL)	-0.311	-0.015	0.258	-0.272	0.005	0.748**	1

*P<0.05 **P<0.01

TARTIŞMA ve SONUÇ

Babesiosis Ixodidae familyasına bağlı kenelerle taşınan bir kan hastalığıdır. Koyunlarda mevsimsel görülen önemli bir hastalıktır. Hastalığın teşhisi mikroskopik bakı, serolojik veya moleküler metodlarla yapılır (Esmailnejad ve ark 2012).

Babesia türleri intravasküler hemoliz yaparak anemiye, hemoglobinemiye ve hemoglobinüriye yol açmaktadır. Eritrositlerin parçalanmasında dolayı eritrosit sayısı, hematokrit ve hemoglobin seviyeleri azalmaktadır. Bu

çalışmada babesiozisli koyunlarda RBC, HCT ($p<0,001$), HGB ($p<0,05$) değerlerinin istatistiksel olarak azaldığı görüldü. Hemoglobin seviyelerindeki azalmanın istatistiki olarak daha az olmasının nedeni intravasküler hemolizden dolayı hemoglobinemi olması ve hemoglobinin tamamen dolaşımdan uzaklaştırılmamasından dolayı olabileceği kanısına varıldı. (Tablo 1) Bu çalışmada babesiozisli koyunlar için RBC, HCT, HGB değerleri birçok araştırıcının çalışma sonuçları ile (Çiçek ve ark 2004, Kılınç ve ark 2015) paralellik arz etmektedir.

Lökosit değerlerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu bu artışın stres lökogramı veya sekonder

enfeksiyona bağlı olabileceği kanısına varıldı. Formül lökosit değerlendirildiğinde nötrofil değerlerinde kontrol grubuna göre azalma ($p<0,05$) meydana gelirken, lenfosit, monosit ve bazofil yüzdesinde ise artış ($p<0,05$) görüldü. Ayrıca PLT sayılarında önemli oranda ($p<0,05$) azalma belirlendi.

Demir organizmada özellikle hemoglobin ve myoglobin gibi hem bileşikleri ile ve hem olmayan transferrin, ferritin ve hemosiderin yapısında proteinlerle kompleks halde bulunur. Vücuttaki demirin %55-60'ı eritrosit hücresinin içinde hemoglobinde bulunmaktadır (Turgut, 2000, Uyanık, 2000). Serum Fe seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistikî önem olmamasına rağmen artış ($p>0,05$) görüldü. Bu artış muhtemelen intravasküler hemoliz ve buna bağlı açığa çıkan Fe'e bağlı olmaktadır

Hepsidin, yangısal uyarılara ve yüksek demir seviyesine bir cevap olarak karaciğerde üretilen, düşük molekül ağırlıklı antibakteriyel bir peptid hormondur ve demir depoları ve kemik iliğindeki eritropoietik aktivite tarafından kontrol edilerek salınmakta ve demirin homeostazisinde rol almaktadır (Singh ve ark., 2011, Badial ve ark, 2011). Hipoksi ve demir depolarının düşük olduğu anemide ise, hepsidin üretimi azalır Bu çalışmada hepsidin seviyesinin babesia grubunda kontrole göre istatistikî olarak yüksek ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Bu durumun intravasküler hemolize bağlı olarak oluşan anemi sonucu serum demir seviyelerinin yüksek olmasına bir cevap olabileceği kanısına varıldı.

Hepsidin mRNA'sı vücudun Fe seviyesine paralel hareket etmektedir. Fe seviyesi artığında artma, azaldığında azalma meydana gelmektedir. Fe depoları yeterli veya yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır. Demirin barsaklardan emilimi, hepatik depolardaki Fe salınımı ve makrofajlardaki Fe döngüsünün kontrolü hepsidin tarafından düzenlenir (Singh ve ark., 2011, Ganz ve Nemeth, 2012). Bu çalışmada serum hepsidin ile Fe seviyeleri arasında negatif korelasyon olmasına rağmen istatistikî olarak önem ($p>0,05$) belirlenmedi (Tablo 2).

Sonuç olarak, babesiosizli koyunlarda eritrosit parametrelerinde azalma, stres lökogramının geliştiği, demir parametrelerinde ve hepsidin seviyelerinde artmaların olduğu ve diagnostik öneminin olabileceği kanısına varıldı.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015-HIZ-VF176 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Badial PR, Oliveira FJP, Cunha PHJ et al. (2011).** Influence of experimental inflammatory response on hepatic hepsidin gene expression and plasma iron concentration in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141, 157-161.
- Başol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE (2007).** Demir Hemostazının Yeni Düzenleyicisi Hepsidin. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5, 117-125.
- Çelik B (2005).** Yenidoğan döneminde serum prohepsidin düzeylerinin tam kan sayımı, demir parametreleri ve sepsis ile ilişkisi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.
- Chaudhuri S, Varshey J.P, Patra RC (2008).** Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Research in Veterinary Science*, 85, 120-124.
- Çicek H, Düzgün A, Emre Z, Karaer Z (2004).** Seroprevalence of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. *Turk J Vet Anim Sci*, 28:683-686
- Esmailnejad B, Tavassoli M, Rezaei SA (2012).** Investigation of haematological and biochemical parameters in small ruminants naturally infected with *Babesia ovis*. *Veterinary Research Forum*, 3 (1): 31-36.
- Furlanello T, Fiorio F, Caldin M et al. (2005).** Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 134,1-2: 77-85
- Ganz T, Nemeth E (2012).** Hepsidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 1434-1443.
- Kılınç Oruç Ö, Göz Y, Yüksek N et al. (2015).** Determination of serum cardiac biomarkers and plasma D-dimer levels in anemic sheep with babesiosis. *Turk J Vet Anim Sci*, 39, 606-610.
- Rossi E (2005).** Hepsidin-the iron regulatory hormone. *Clin Biochem Rev*, 26,3, 47-49.
- Schorn S, Pfister K, Reulen H et al. (2011).** Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors*, 4, 135.
- Sevinç F, Caob S, Zhou M et al. (2015).** A new immunoreactive recombinant protein designated as rBoSA2 from *Babesia ovis*: Its molecular characterization, subcellular localization and antibody recognition by infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 214, 213-218.
- Singh B, Arora S, Agrawal P et al. (2011).** Hepsidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta*, 412(11-12): 823-830.
- Turgut K (2000).** Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis, 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ. Konya.
- Uyanık F (2000).** Bazı iz elementlerin organizmadaki başlıca fonksiyonları ve bağışıklık üzerine etkileri. *Erciyes Üniv. J Health Sci*, 9 (2). 49-58.
- Yur F, Yazar M, Değer Y, Dede S (2010).** Na⁺/K⁺ATPase activity in sheep with natural Babesiosis. *Acta Vet Brno*, 79: 233-236.



Risperidone Therapy in a Dog with Dissociative Syndrome

Duygu DALĞIN¹ Metin ÇENESİZ²

¹ Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Samsun, Turkey

² Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Samsun, Turkey

Received: 16.02.2017

Accepted: 13.04.2017

SUMMARY

Recently described dissociative syndrome is a progressive behavioral disorder with poor prognosis and almost 28% of animals do not seem to respond to the treatment. In the absence or lack of proper treatment, dissociation worsens and leads to severe cachexia. 4 years old Cocker spaniel-terrier mix male dog referred with complaints including receptivity loss to the environment, inattentiveness, dumb-looking periods, activity avoidance, withdrawal, and snapping the air as fly chasing without a reason. After elimination of somatic reasons, dissociative syndrome was diagnosed based on the history and behavioral examination. 0.5 ml Risperdal oral solution 1g/1m², 100 ml (Eczacıbaşı) was used sid based on 1 mg/m² dose for 11 kg dog (0.49 m²). Before and 1 month after therapy, serum serotonin and because of reported prolactin elevation, prolactin levels were measured. Before and after therapy, there was not a beyond reference value serotonin (370.5-441.9 ng/ml) and prolactin (1.8-2.1 ng/ml) difference. Significant clinical improvement, interactive and relatively increased receptivity and contact, not completely lost, but faded and decreased hallucitative symptoms were observed.

Key Words: Dissociative syndrome, Dog, Risperidone, Prolactin, Serotonin, Hallucination

ÖZET

Disosiyatif Sendromlu Bir Köpeğe Risperidon Tedavisi

Son zamanlarda tanımlanan disosiyatif sendrom, prognozu kötü olan ilerleyici bir davranış bozukluğudur ve hayvanların neredeyse %28'inde tedaviye yanıt vermemektedir. Tedavi edilmez veya tedaviye cevap vermezse, durum kötüleşir ve ciddi kaşeksi oluşturur. Materyali, çevreye duyarsızlık kaybı, dikkatsizlik, aptal görümlü dönemler, hareketsizlik, içine kapanma ve havada olmayan sineğin peşinden koşmak gibi şikayetleri olan 4 yaşında Cocker spaniel-terrier erkek köpek oluşturdu. Somatik nedenlerin ortadan kaldırılmasından sonra, öykü ve davranışsal inceleme temel alınarak disosiyatif sendrom teşhis edildi. 11 kg köpek (0.49 m²) için 0.5 ml Risperdal oral solüsyon 1 g/1 m², 100 ml (Eczacıbaşı) kullanıldı. Tedaviden önce ve tedaviden 1 ay sonra serum serotonin ve prolaktin düzeyleri ölçüldü. Tedaviden önce ve sonra, referans değerden yüksek bir serotonin (370.5-441.9 ng / ml) ve prolaktin (1.8-2.1 ng/ml) görülmedi. Klinik olarak çevreye karşı ilginin artması, sosyalleşme ve dikkat toplamada düzelleme tamamen kaybolmasa bile oldukça azalmış halüsitatif semptomları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Disosiyatif sendrom, Köpek, Risperidon, Prolaktin, Serotonin, Halüsinasyon

INTRODUCTION

Recently described dissociative syndrome is characterised by a progressive loss of relationships with the real world in favor of increasingly severe hallucinatory type episodes (Landsberg et al. 2003). Family prevalence is important. Prognosis is poor and almost 28% of animals do not seem to respond to the treatment (Pageat 2012). In the absence or lack of proper treatment, dissociation worsens and leads to severe cachexia (Landsberg et al. 2003). Symptoms of the disorder are categorised into two classes and diagnosis is based on the presence of the three of class 1 symptoms (Landsberg et al. 2003; Landsberg et al. 2012);

- Disorder appears between pre-puberty and 5 years age
- Agrowing loss of receptivity to the environment
- Existence of hallucinatory episodes with constant themes
- Stereotypes during hallucinatory episodes
- Dumb looking phases with somatosensory activity
- Existence of a pre-morbid stage of the avoidance or impulsive type

where the existence of at least one class 2 symptom confirms the diagnosis to the best of our knowledge, no study or case report exists addressing the syndrome in literature except the basic book information (Landsberg et

al. 2003; Landsberg et al. 2012) and the work of Pageat (2012).

CASE

4 years old Cocker spaniel-terrier mix, intact male dog referred to our university clinics with complaints including receptivity loss to the environment, inattentiveness, dumb-looking periods, activity avoidance, withdrawal, and snapping the air as fly chasing without a reason especially for the last 3 months. The owners were worried about the listlessness of their previously joyful and playful dog and also were quite worried about the sudden scary, unreasonable episodes of snapping the emptiness. They stated that their dog was alienating slowly day by day.

A comprehensive physical examination, serum biochemistry, urinalysis and complete blood count were performed and the absence of any disorders eliminated a primary somatic origin.

As described before (Landsberg et al. 2003; Landsberg et al. 2012), Class 1 symptoms of dissociative syndrome includes; (1) disorder appears between the pre-puberty period and five years, (2) a growing loss of receptivity to the environment, (3) existence of hallucinatory episodes with constant themes, (4) production of stereotypes during hallucinatory phases, (5) existence of dumb-looking phases with somatosensory activity, (6) existence of pre-morbid stage of the avoidance or impulsive type and Class 2 symptoms includes; (1) uni- or bilateral dilatation of the lateral ventricles, (2) presence of isolated peaks on the EEG, (3) demodicosis. History and behavioral examination revealed five of class 1 symptoms, so the dog was diagnosed as dissociative syndrome.

Treatment choices include selegiline and fluoxetine, but the results obtained with these two treatments were observed to be transitory (Landsberg et al., 2003). Risperidone is stated as the treatment of choice at a dose of 1mg/m² once a day (Beata 2001; Landsberg et al., 2003; Landsberg et al., 2012). Risperidone, a representative drug of atypical antipsychotics, is a serotonin type 2 (5-HT₂) and dopaminergic D₂ receptor antagonist, used in human medicine in schizophrenia, bipolar mania and irritability associated with autistic disorder (Schotte et al., 1996). In dogs, it is also used in sociopathy stage 1 when the warning phases are still complete, social directed regression, sociopathies, impulsive aggression, hallucinatory type signs with considerable safety (Mannens et al. 1994; Meuldermans et al. 1994; Ader et al. 2005).

0.5 ml Risperdal oral solution 1 g/1 ml, 100 ml (Eczacıbaşı) was used sid based on 1 mg/m² dose for 11 kg dog (0.49 m²). Before and 1 month after therapy, serum serotonin and, because of reported prolactin elevation (Meuldermans et al. 1994; Tian et al. 2014), prolactin levels were measured.

Before and following therapy, there was not a beyond reference value serotonin (370.5-441.9 ng/ml) and prolactin (1.8-2.1 ng/ml) difference (Corrada et al. 2006).

Significant clinical improvement regarding behavioral assessment, interactive behavior, relatively increased receptivity and contact, not completely lost, but faded and decreased hallucinatory symptoms were observed in the patient and these findings were consistent with the 5 month follow up examinations.

DISCUSSION

Average age of the dogs affected has been stated between 12-20 months, but generally disorder appears between pre-puberty period and five years (Landsberg et al. 2003; Landsberg et al. 2012). The present patient was 4 years old, concordant with the given age spectrum.

Family prevalence is important and the reported races most inclined are German shepherds, Bull terriers, Irish setters, Rottweilers, Dobermans, Pyrenean Shepherds, and some cross breeds of Shepherds and Spaniels (Landsberg et al. 2003; Landsberg et al. 2012). Our patient was also a cross breed spaniel.

Dissociative syndrome in the dog has newly been described and this diagnostic category is not used in North America yet (Landsberg et al. 2003; Landsberg et al. 2012).

A similar condition, psychomotor seizures characterised by loss of contact with the external environment, by hallucinations of visual events, or by visceral sensations (tastes and smells) that are pleasing or distasteful is described in human medicine. They are accompanied by visceral motor activity, such as pupillary dilation, and by somatic motor activity consisting of wildly running around as though searching for something, along with an excessive expression of emotion (DeLahunta and Glass 2009). Also complex partial seizures (psychomotor seizures) have been observed in dogs that have lesions in the piriform lobe or hippocampus (DeLahunta and Glass 2009), representing similar symptoms. Therefore, dissociative syndrome may be suspected to be a kind of psychomotor seizure, but, to describe a disorder as a seizure, it has been stated that autonomic symptoms such as episodes with salivation, urination and defecation must be presented (Thomas 2010). As these symptoms are absent in the dissociative syndrome of dogs, seizure etiology can be eliminated, but the presence of peaks on the EEG which is among the Class 2 symptoms are still confusing.

CONCLUSION

In conclusion, dissociative syndrome must be considered in behavioral diagnostics and risperidone provided satisfactory effect and didn't change serotonin and prolactin levels. Dissociative syndrome is generally underdiagnosed, to the best of our knowledge there is no study on this topic. So the present paper is the first case report on the dissociative syndrome described and symptomatically treated in a dog.

REFERENCES

- Ader M, Kim SP, Catalano KJ, Ionut V, Huckling K, Richey JM, Kabir M, Bergman RN (2005). Metabolic dysregulation with atypical antipsychotics occurs in the absence of underlying disease: A placebo-controlled study of Olanzapine and Risperidone in dogs. *Diabetes*, 54 (3), 862-871.
- Beata CA (2001). Diagnosis and Treatment of Aggression in Dogs and Cats. In: Houpt KA (Ed), *Recent Advances in Companion Animal Behavior Problems*. International Veterinary Information Service (<http://www.ivis.org>), Ithaca, NY, Document No. A0808.1201.
- Corrada Y, Rimoldi I, Arreseigor S, Marecco G, Gobello C (2006). Prolactin reference range and pulsatility in male dogs. *Theriogenology*, 66, 1599-1602.
- DeLahunta A, Glass E (2009). *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*: Saunders, Elsevier, Missouri, pp. 451.
- Landsberg GM, Hunthausen W, Ackerman L (2003). *Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat*. Second Edition, Saunders, Elsevier Health Sciences, Missouri, pp. 128, 472-474.
- Landsberg GM, Hunthausen W, Ackerman L (2012). *Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat 3*. Saunders, Elsevier Health Sciences, Missouri, pp. 166, 358-359, 420.

- Mannens G, Meuldermans W, Snoeck E, Heykants J (1994).** Plasma protein binding of risperidone and its distribution in blood. *Psychopharmacology*, 114(4), 566-72.
- Meuldermans W, Hendrickx J, Mannens G, Lavrijsen K, Janssen C, Bracke J, Le Jeune L, Lauwers W, Heykants J (1994).** The metabolism and excretion of risperidone after oral administration in rats and dogs. *Drug Metab Dispos*, 22(1), 129-138.
- Pageat P (2012).** Terminology, Behavioral Pathology and the Pageat (French) Approach to Canine Behavior Disorders. In: Landsberg G, Hunthausen W, Ackerman L (Eds), *Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat*. 3rd edition, Saunders, Elsevier Health Sciences, Missouri, pp. 359.
- Schotte A, Janssen PFM, Gommeren W (1996).** Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology*, 124, pp. 57-73.
- Thomas WB (2010).** Idiopathic epilepsy in dogs& cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40, 161-179.
- Tian J, Wang W, Ye L, Cen X, Guan X, Zhang J, Yu P, Du G, Liu W, Li YA (2014).** 12-week intramuscular toxicity study of risperidone-loaded microspheres in Beagle dogs. *Hum Exp Toxicol*, 33(5), 473-87.





Traumatic Myiasis Associated with *Wohlfahrtia magnifica* and *Lucilia sericata* Larvae in Dog

Sami GÖKPINAR¹ Birkan KARSLI²

¹Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Kırıkkale, Turkey

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

Received: 02.03.2017

Accepted: 28.04.2017

SUMMARY

A large number of fly larvae were determined in the neck area of a dog brought to the clinics of Kırıkkale University Veterinary Faculty. These determined larvae were identified by considering the morphological characteristics of the cephalo-pharyngeal skeleton with the anterior and posterior spiracles of the larvae. These larvae were found to be third stage larvae of *Wohlfahrtia magnifica* and *Lucilia sericata*.

Key Words: Dog, Myiasis, *Lucilia sericata*, *Wohlfahrtia magnifica*

ÖZET

Bir Köpekte *Wohlfahrtia magnifica* ve *Lucilia sericata* Larvalarına Bağlı Travmatik Myiasis Olgusu

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen bir köpeğin boyun bölgesindeki yarada çok sayıda sinek larvası tespit edilmiştir. Tespit edilen bu larvaların tür teşhisleri, larvaların anterior ve posterior stigmaları ile sefalo-faringeal iskeletin morfolojik özellikleri göz önüne alınarak yapılmıştır. Bu larvaların *Wohlfahrtia magnifica* ve *Lucilia sericata* üçüncü dönem larvaları oldukları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Myiasis, *Lucilia sericata*, *Wohlfahrtia magnifica*

GİRİŞ

Myiasis, bazı Diptera larvalarının en az bir zorunlu döneminde insan ve omurgalı hayvanların canlı veya ölü dokuları, vücut sıvıları ve sindirilmiş gıdaları ile beslenmeleri sonucu meydana getirdiği patolojik durumdur. Myiasis; zorunlu, isteğe bağlı veya rastlantısal olabilmektedir (Dinçer 1997). Larvalar deri, deri altı bağ dokusu, yumuşak dokular, göz, ağız, burun, mide, bağırsak, genital sistem ve kulakta parazitlenebilir (Eren ve ark. 2010).

Myiasise neden olan sineklerin büyük bir kısmı Calliphoridae, Hypodermatidae, Sarcophagidae, Oestridae ve Gasterophilidae ailelerinde yer alır (Dik 2015). Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Sarcophagidae ailesinde bulunan ve zorunlu myiasis etkeni olan *W. magnifica* ile Calliphoridae ailesinde bulunan ve fakültatif myiasis etkeni olan *L. sericata* larvalarının hayvanlarda ve insanlarda travmatik myiasis'e sebep olan dominant türler oldukları bildirilmiştir (Gaglio ve ark. 2011; Aldemir ve ark. 2012; Dik ve ark. 2012). Bu iki tür dışında köpeklerde çeşitli myiasis vakalarından *Oestrus ovis*, *Cutarebra* spp., *Cordylobia anthropophaqa*, *Calliphora vomitara*, *Lucilia eximina* ve *Chrysomya albiceps* türleri de bildirilmiştir (Samsar 1986; Ogo ve ark. 2009; McGarry ve ark. 2011; Moshaverinia ve Kazemi Mehrjerdi 2016; Munoz-Garcia ve

ark. 2016; Zanzani ve ark. 2016).

Köpeklerde travmatik myiasis vakalarında bugüne kadar genellikle tek türle enfestasyon olguları bildirilmiştir (Şaki 2004; Ütük 2006; Eren ve ark. 2010, Aldemir ve ark. 2012; Işık ve Dik 2015). Bu olguda ise bir köpekte boyun bölgesindeki geniş doku kayıplı yarada hem *W. magnifica* hem de *L. sericata*'nın üçüncü dönem larvaları tespit edilmiştir. Bu nedenle olgunun yayınlanması tarafımızdan uygun görülmüştür.

OLGU TANIMI

2016 yılı Eylül ayında Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 3 yaşında, erkek kangal melez köpeğin boyun bölgesindeki geniş yarada çok sayıda sinek larvasının bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).

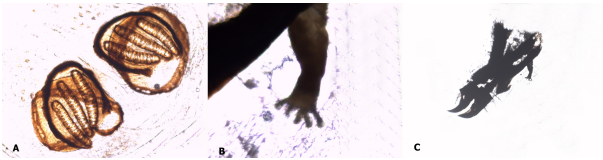
Bu larvalar toplanmış ve %70'lik etil alkol içerisinde Parazitoloji Anabilim Dalı Entomoloji laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvarda larvalar yıkanmış ve tekrar temiz %70'lik etil alkol içerisine alınmıştır. Larvalar daha sonra bir petri kutusu içerisine alınarak üzerine sıcak %70'lik etil alkol dökülüp, tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tespit solüsyonundan çıkarılan bu larvalar bir müddet soğutulduktan sonra içerisinde temiz alkol bulunan şişelere aktarılmıştır. Bu

larvalar bu şişelerden çıkartılarak üzerine bir bisturi yardımıyla delikler açıldıktan sonra %30'luk KOH içerisine alınmıştır. Şeffaflaşan larvalar distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra teşhis için uygun alanlar stereo mikroskop altında diseke edilerek entellan ile lam üzerine monte edilmiştir. Daha sonra diseke edilen kısımlar mikroskop altında incelenerek larvaların tür teşhisleri yapılmıştır (Zumpt 1965; Özdal ve Değer 2005).



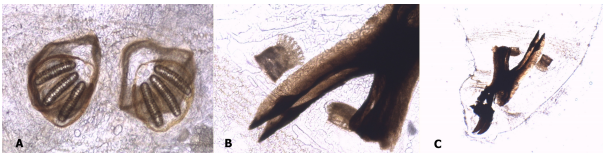
Şekil 1. Köpek boyun bölgesindeki yarada bulunan larvaların görünüşü

Figure 1. Appearance of the larvae in the dog neck area



Şekil 2. *Wohlfahrtia magnifica*'nın üçüncü dönem larvası A: Posterior stigma B:Anterior stigma C: sefalo-faringeal iskelet

Figure 2. The third stage larvae of *Wohlfahrtia magnifica* A: Posterior spiracles B:Anterior spiracles C: cephalo-pharyngeal skeleton



Şekil 3. *Lucilia sericata*'nın üçüncü dönem larvası A: Posterior stigma B:Anterior stigma C: sefalo-faringeal iskelet

Figure 3. The third stage larvae of *Lucilia sericata* A: Posterior spiracle B:Anterior spiracle C: cephalo-pharyngeal skeleton

Toplanan 218 adet larva anterior ve posterior stigmalar ile sefalo-faringeal iskeletin morfolojik özellikleri göz önüne alınarak incelenmiş ve büyük bir kısmının (%92.2) *W.*

magnifica (Şekil 2), az bir kısmının ise (%7.8) *L. sericata*'nın (Şekil 3) üçüncü dönem larvaları olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Diptera dizisi, Calliphoridae ve Sarcophagidae ailelerinde bulunan sinekler dünya genelinde travmatik myiasise neden olmaktadır. Bu ailedeki bazı türler zorunlu myiasise etkeni iken bazıları ise fakültatif olarak myiasise sebep olmaktadır.

Günümüze kadar dünya genelinde yapılan çalışmalarda, köpeklerde travmatik myiasis vakalarında *W. magnifica* en yaygın tespit edilen tür iken, ikinci sıradaki tür ise *L. sericata* olmuştur. Ütük (2006) pointer cinsi bir av köpeğinin meme bölgesindeki lezyonlardan topladığı tüm larvaların, Şaki (2004) Elazığ bölgesinde travmatik myiasis görülen 18 köpekten alınan tüm larvaların, Kılınc ve ark. (2013) Van'da bir köpeğin ense yarısından topladığı 120 larvanın tümünün, Dik ve ark. (2012) 13 köpeğin 8'inden, Orfanou ve ark. (2011) 7 köpeğin tümünden, Schnur ve ark. (2009) ise 55 köpeğin 54'ünden toplanan larvaların *W. magnifica* türüne ait olduklarını bildirmişlerdir. Eren ve ark. (2010) bir köpeğin sırt ve boyun bölgesinden toplanan 22 larvanın tümünün, Işık ve Dik (2015) bir köpeğin kulak çevresindeki yaradan topladıkları larvaların tümünün, Choe ve ark. (2016) bir köpeğin sol gluteal bölgesinden topladıkları 216 sinek larvasının *L. sericata* olduğunu tespit etmişlerdir. Aldemir ve ark. (2012) bir köpeğin sağ arka tarafından topladıkları 27 larvanın tümünün *Lucilia* spp. olduklarını ifade etmişlerdir. Sunulan bu vakada köpeğin boyun bölgesindeki yaradan toplanan larvaların büyük bir kısmının (%92.2) *W. magnifica*, az bir kısmının ise (%7.8) *L. sericata*'nın üçüncü dönem larvaları oldukları tespit edilmiştir. Daha önce sunulan travmatik myiasis olgularında genellikle tek tür tespit edilmiş iken, sunduğumuz olguda tek bir yara bölgesinde iki farklı türe ait larvalar tespit edilmiştir. Bu durum travmatik myiasis vakalarında birden fazla tür etkenin aynı anda bulunabileceğini göstermektedir.

Köpeklerde travmatik myiasisin yanı sıra oftalmik (Crumley ve ark. 2011; Delgado 2012), oral (Sevgili ve ark. 2009), nasal (McGarry ve ark. 2011; Zanzani ve ark. 2016) ve genital myiasis (Gaglio ve ark. 2011) vakaları da bildirilmiştir.

Türkiye'de köpekler dışındaki diğer omurgalı hayvanlarda da *W. magnifica* ve *L. sericata* kaynaklı myiasis vakalarına rastlanmıştır. *Wohlfahrtia magnifica* koyunlarda travmatik ve oral (Şaki ve Özer 1999; Aydenizöz ve Dik 2008; Dik ve ark. 2012), sığırlarda ve keçilerde ise travmatik myiasis vakalarında tespit edilmiştir (Şaki ve Özer 1999; Dik ve ark. 2012). *Lucilia sericata* ise, ceylanda genital (Sevgili ve ark. 2004), sığır, kızıl şahin ve leş kargasında travmatik (Dik ve ark. 2012), kedide oküler, genital ve travmatik (Yücel ve ark. 2008; Eren ve ark. 2010; Dik ve ark. 2012) ve keçilerde ise travmatik myiasis vakalarında tespit edilmiştir (Dik ve ark. 2012). Bu çalışmalarda *W. magnifica* daha çok travmatik myiasis vakalarında tespit edilirken, *L. sericata* travmatik myiasisin yanı sıra birçok farklı myiasis vakalarında da ortaya konmuştur.

Gerek zorunlu myiasis etkenleri ve gerekse fakültatif myiasis etkenleri hayvanlarda huzursuzluk, iştahsızlık, kilo kaybı, yapağı ve deri kalitesinin bozulması ile verim kaybı sonucunda önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ekonomik değeri olan hayvanlarda yukarıda bahsedilen durumlar ekonomik kayıp oluştururken, pet hayvanlarımızda özellikle travmatik myiasis sonucu oluşan

yaraların tedavi masrafları ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle myiasis vakalarını en aza indirmek ve/veya ortadan kaldırmak amacıyla sinek mücadelesinin doğru ve bilinçli bir şekilde yapılması, sineklerin üreme alanlarının en aza indirilmesi, hayvanlarda ve insanlarda yaraların usulüne uygun olarak sürekli kontrol edilip sağaltımının yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aldemir OS, Ural K, Aysul N, Derincegöz O, Şimşek E, Gülce-Güler A (2012).** Bir köpekte travmatik myiasis olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 36, 109-111.
- Aydenizöz M, Dik B (2008).** Bir Kuzuda *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae)'dan kaynaklanan gingival miyaz olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 32,79-81.
- Choe S, Lee D, Park H, Jeon HK, Kim H, Kang JH, et al. (2016).** Canine wound myiasis caused by *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in Korea. *Korean J Parasitol*, 54 (5), 667-671.
- Crumley WR, Rankin AJ, Dryden MW (2011).** Ophthalmomyiasis externa in a puppy due to *Cutarebra* infestation. *J Am Anim Hosp Assoc*, 7, 150-155.
- Delgado E (2012).** Symbropharon secondary to ophthalmomyiasis externa in a dog. *Vet Ophthalmol*, 15 (3), 200-205.
- Dik B (2015).** Veteriner Entomoloji. S.Ü Basımevi, Konya.
- Dik B, Uslu U, Işık N (2012).** Myiasis in animals and humanbeings in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (1), 37-42.
- Dinçer Ş (1997).** İnsan ve hayvanlarda myiasis. In: Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları & Vektörler, Özcel MA, Daldal N (Ed), 169-235, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:13, İzmir.
- Eren H, Aypak S, Ural K, Seven F (2010).** *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) larvalarına bağlı kedide ocular ve köpekte travmatik myiasis olguları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(5), 883-886.
- Gaglio G, Brianti E, Abbene S, Giannetto S (2011).** Genital myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) in Sicily (Italy). *Parasitol Res*, 109, 1471-1474.
- Işık N, Dik B (2015).** Bir köpekte *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)'dan kaynaklanan travmatik myiasis olgusu. *Eurasian J Vet Sci*, 31(4), 242-244.
- Kılınç ÖO, Oğuz B, Sona A, Biçek K, Özdal N, Değer MS (2013).** Bir köpekte *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862; Diptera: Sarcophagidae) larvalarından ileri gelen travmatik myiasis olgusu. *Animal Health Prod and Hyg*, 2 (2), 209-211.
- McGarry J, Penrose F, Collins C (2012).** *Oestrus ovis* infestation of a dog in the UK. *J Small Anim Pract*, 53, 192-193.
- Moshaverinia A, Kazemi Mehrjerdi H (2016).** Canine Myiasis and Its Causal Agents in Northeastern Iran. *Iran J Parasitol*, 11 (1), 91-97.
- Munoz-Garcia CI, Lorenzo-Burgunder D, Gumi Castillo G, Perello-Undreiner DB, Zenteni-Nava E, Orozco-Gregorio H (2016).** Canine myiasis by *Lucilia eximiana* in North America. *Trop Biomed*, 33(3), 494-499.
- Ogo NI, Onovoh E, Ayodele DR, Ajayi OO, Chukwu CO, Sugun M, et al. (2009).** Cutaneous canine myiasis in the Jos metropolis of Plateau State, Nigeria, associated with *Cordylobia anthropophaga*. *Veterinarski Arhiv*, 79 (3), 293-299.
- Orfanou DC, Papadopoulos E, Cripps PJ, Athanasiou LV, Fthenakis GC (2011).** Myiasis in a dog shelter in Greece: Epidemiological and clinical features and therapeutic considerations. *Vet Parasitol*, 181, 374-378.
- Özdal N, Değer S (2005).** Van ve yöresinde travmatik myiasis larvalarının gelişmeleri ve identifikasyonları. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16 (2), 81-85.
- Samsar E, Güzel N, Karaer Z, Yavru N, Gürkan M (1986).** Köpek gözünde *Calliphora vomitoria* olgusu. *Selçuk Univ Vet Fak Derg*, 2 (1), 167-170.
- Schnur HJ, Zivotofsky D, Wilamowski A (2009).** Myiasis in domestic animals in Israel. *Vet Parasitol*, 161, 352-355.
- Sevgili M, Altaş MG, Gökçen A (2009).** Bir köpekte oral myiasis olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 33 (1), 92-94.
- Sevgili M, Şaki CE, Gökçen A (2004).** Bir ceylanda genital myiasis olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 28 (4), 202-204.
- Şaki CE (2004).** Elazığ'da köpeklerde tespit edilen travmatik myiasisler. *FÜ Sağlık Bil Vet Derg*, 18, 29-33.
- Şaki CE, Özer E (1999).** Elazığ ve çevresinde sığır, koyun ve keçilerde myiasisler ve bunların tedavileri. *Turk J Vet Anim Sci*, 23, 261-268.
- Ütük AE (2006).** Bir köpekte travmatik myiasis olgusu. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 20 (1), 97-99.
- Yücel Ş, Çiçek H, Kar S, Eser M (2008).** Bir kedide genital myiasis olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 32 (3), 241 - 243.
- Zanzani SA, Cozzi L, Olivieri L, Gazzonis AL, Manfredi MT (2016).** *Oestrus ovis* L.(Diptera: Oestridae) Induced Nasal Myiasis in a Dog from Northern Italy. *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Veterinary Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5205416>.
- Zumpt F (1965).** Myiasis in man and animals in the old World. Butterworth & Co. Ltd. London.





Can New Strategies Be An Alternative To Antiviral Drug Resistance?

Zafer YAZICI

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Samsun, Turkey

Received: 30.03.2017

Accepted: 07.07.2017

SUMMARY

Viral agents have been continuing to cause life threatening chronic infections, deaths and economic losses in humans and animals. Recently a limited number of antiviral drug is available to treat human, animal and zoonotic virus infections. The emergence of resistance to these antivirals has created an obstacle for the treatment of patients who infected with viruses. To struggle with viral infections, there is need to prevent the emergence of antiviral drug resistance by developing the new strategies or tactics. Recently fidelity variants and lethal mutagenesis is considered to be an effective strategy for the prevention of drug resistance. This review summarises the new strategies and antiviral mechanisms being tried to develop in order to fight viral infections.

Key Words: Virus, Antiviral drugs, Lethal mutagenesis, Fidelity variants

ÖZET

Yeni Stratejiler Antiviral İlaç Direncine Alternatif Olabilir mi?

Viral ajanlar, insanlarda ve hayvanlarda hayatı tehdit eden kronik enfeksiyonlara, ölümlere ve ekonomik kayıplara neden olmaya devam etmektedir. Günümüzde insan, hayvan ve zoonotik virus enfeksiyonlarının tedavisi için sınırlı sayıda antiviral ilaç mevcuttur. Oluşan antiviral ilaç direnci bu viruslar ile enfekte hastaların tedavisi için engel teşkil etmektedir. Viral enfeksiyonlar ile mücadele için yeni stratejiler ya da taktikler geliştirilerek oluşan antiviral ilaç direncinin önlenmesine ihtiyaç vardır. Günümüzde fidelite varyantlarının ve letal mutagenезin ilaç direncinin önlenmesi için etkili stratejiler olduğu düşünülmektedir. Bu derleme viral enfeksiyonlar ile mücadele amacı ile geliştirilmesi denenen yeni stratejileri ve antiviral mekanizmaları özetlemektedir.

Anahtar Kelimeler: Virus, Antiviral ilaçlar, Letal mutagenез, Fidelite varyantları

INTRODUCTION

As the most important pathogens to produce casualties, chronic life-long diseases or economic losses, viruses have been continuing to cause a global threat (Lazaro 2011, Lou et al. 2014, Martinez et al.2015). These agents can infect all species on Earth including human, animal, plant, insect, bacteria as well as archaea (Costa et al. 2012).At all stages of life, many of the dangers to human health arise from viral infections such as haemorrhagic fever viruses including *Ebola virüs (EBOV)*, *Crimean Congo Haemorrhagic Fever virus (CCHFV)*, *human immunodeficiency virus (HIV)*, *SARS-coronavirus*, *influenza virus*, *hepatitis A, B and C viruses (HAV, HBV and HCV)*. Similarly, some viruses such as *bluetongue virus (BTV)*, *foot and mouth disease virüs (FMDV)*, *pestiviruses* present the greatest risk to animals (Costa et al. 2012).In the course of history, several sizeable viral outbreaks have resulted in the large-scale deaths of animals and human beings. For instance, the influenza pandemic of 1918, described as a global disaster, killed 50 million people which is believed to be higher than the number of people who died in World

War 1 (Taubenger et al. 2006). Likewise, in the 18th and 19thcenturies, *rinderpest virus* infection, known as ‘cattle plague’, spread all over the world with hardly a continent or country left unaffected by this virus. While 200 million cattle in Western Europe were killed by *rinderpest virus* that is known as one the most important *morbilliviruses*, 80 to 90% of all cattle population in South Africa were extinguished (Mack 1970). However, at the beginning of the 21st century, mankind was threatened by two major *influenza virus* outbreaks reminiscent of the 1918 flu pandemic. More recently still, the huge threat to human health posed by the EBOV was demonstrated by the deaths of more than 11.000 people in West Africa (WHO 2015).

Despite the availability of highly effective strategies such as vaccination, public health measures and improvement of hygiene use for the control and eradication of viral diseases in populations, only two known viruses, *smallpox virus* and *rinderpest virus*, have been officially eradicated all over the world, and there are large numbers of viral diseases which still escape control (Martinez et al.2015). In recent years, resistance to antiviral drugs is increasingly

reported as a major challenge, due largely to their over-prescription and over-usage (Costa et al. 2012). In addition, since RNA viruses have flexible genetic structure mutating quickly, and mutations in their genes can lead to the development of the resistance to antiviral drugs, this presents a growing challenge for immunocompromised patients particularly those infected with HIV and HCV (Costa et al. 2012).

MUTATION AND MUTATION FREQUENCIES OF RNA AND DNA VIRUSES

All viruses have either DNA or an RNA genome which always stores their genetic codes. Most RNA viruses cause serious infections to humans as well as animals. Currently, none of the DNA viruses appear in the top of the most serious infectious diseases list whilst RNA viruses are reported to have taken place in the front rows (Belshaw et al. 2008). For those viruses, mutation is their most important feature. Mutational changes occur within the nucleotide sequences of virus genomes. By comparison, it appears that RNA viruses have higher mutation frequency than DNA viruses due to the absence of proof-reading activity associated with RNA-dependent-RNA-polymerases (RdRPS) which known as the enzyme responsible for replication of RNA genome (Graci et al. 2012, Meng and Kwang 2014, Rozen et al. 2014). RNA viruses have 10^{-5} mutations per incorporated nucleotides whilst DNA viruses have 10^{-8} to 10^{-11} error per base pair (Graci et al. 2012). Many RNA viruses infect their hosts which have adaptive immune response that recognize and destroy pathogens. The high mutation of RNA viruses facilitates their escape from neutralising antibodies (Meng and Kwang 2014, Zeng et al. 2014, Pauly and Laurings 2015). Furthermore it provides great adaptability for RNA viruses to restrict the effects of vaccines and antiviral treatment. However there are also negative consequences of mutations which make RNA viruses highly susceptible to those additional mutations known to have deleterious effects on viral fitness, and on the ability to adapt rapidly to new selective pressure (Lazaro 2014).

HIGH AND LOW FIDELITY VARIANTS

Fidelity of RNA viruses is an important factor to constrain within a rangewhich balances virus replication, pathogenesis and tissue tropism that is needed for virus growth (Campagnola et al. 2014, Smith et al. 2014). Viral RDRPs are known to have high mutation rates generating low fidelity mutants (known as mutator variants) as well as high fidelity mutants known as antimutator variants (Campagnola et al. 2014, Novella et al. 2014, Rozen et al. 2014, Xie et al. 2014). There are some differences amongst these mutants (Novella et al. 2014). High fidelity mutants of RNA viruses have higher genetic stability than wild type virus, replicate slowly, generate fewer RNA genomes with great accuracy and a higher specific infectivity; in contrast low fidelity mutants have a high mutation frequency with many errors, replicate quickly, synthesise more RNA genomes which have a lower specific infectivity (Meng and Kwang 2014, Novella et al. 2014, Rozen et al. 2014, Khantun et al. 2015). Unlike low fidelity mutants, high fidelity mutants have a lower mutation frequency due to RdRPs catalysing the replication of genome slowly, thus have a better chance to reject a nucleotide pair improperly (Novella et al. 2014). Despite these differences, overall growth and titers of both high and low fidelity mutants are not significantly different *in vitro* (Rozen et al. 2014). Many researchers have reported that although undergoing genetic changes, high fidelity mutants do not have replicative problems in mammalian cells *in vitro* and may

reach high titers in the relevant cells, behaving like a wild type virus. Moreover, these mutants may attenuate with failures in replication and spread *in vivo* (Lazaro 2014). Low fidelity mutants do not also have replicative problems *in vitro* (Novella et al. 2014, Rozen et al. 2014). Furthermore they are attenuated *in vivo* like high fidelity mutants (Novella et al. 2014, Rozen et al. 2014). The high mutation rate with low fidelity in RNA viruses is reported to be due to three main reasons including a life history, a variety of replication speed and constraintson virus evolution. Depending on these reasons, there are also three major consequences, whichinclude population viability, mutational robustness and small genome (Graci et al. 2008). Hence, these cause-result relationships affect pathogenesis and transmission of RNA viruses during natural infections (Arisa et al. 2014, Smith et al.2014).

ANTIVIRAL DRUGS and DEVELOPMENT OF DRUG-RESISTANT MUTANTS

Currently, antiviral compounds can be categorized into two groups according their effects on viruses and host, consisting of (i) virus-acting antivirals (VAAs) that directly or indirectly target the functions of viral proteins, enzymes and the stages of virus replication cycle, and (ii) host-acting antivirals (HAAs) that regulate the immune response and cellular process of a host (Lou et al. 2014, Martinez et al.2015). In recent times, VAAs are most commonly applied in the treatment of HIV, HCV and HBV, herpes and influenza viruses. In 2014, it has been reported that of the 50 known VAAs approved by the American Food and Drug Administration (FDA), 26 are used against HIV (Martinez et al.2015). In addition to, interferon, antibodies and vaccines are also known to be HAAs are applied against viral infections (Lou et al. 2014, Martinez et al.2015). Most VAAs have a direct inhibitory effect on viral proteins and enzymes which include polymerases and proteases (Lou et al. 2014). When they are applied, attachment, entry, polymerase and protease activities are inhibited; thus the titer of virus starts decreasing to such an extent that, in terms of the immune system, this might be an opportunity to clear infection. In the implementation of these drugs, it is inevitable that mutations causing single amino acid replacement can become, and result in the emergence of, drug-resistant virus mutants (DRVM) (Lazaro 2011). These mutations might not have been important when evaluating in terms of acute viral infection; because the immune system succeeds in controlling the replication of virus as well as DRVM.

Nevertheless, the emergence of DRVM is a serious problem for those persistent infections which allow sufficient time for the natural selection that causes single amino acid mutations, thus permitting the growth of resistant viruses which cause treatment failure. In presence of drugs, emerging DRVM can be low frequency in the virus population until their replication exceeds the rest of mutants (Lazaro 2011). Furthermore, it is possible to confront with compensatory mutations that can help DVRM to increase their fitness. This may create a risk for treatment because, even if it stops, resistance and transmission of DVRM may continue to be implicated in an increasingly serious problem for the treatment of persistent infections such as HIV, HCV (Lazaro 2011). In this case we are left to wonder how we will find a successful therapy for RNA viruses, or how we will protect people during outbreaks of highly pathogenic viral infections, such as those caused by influenza virus, ebola virus and others. DRVM seems to be a hurdle or an antiviral monotherapy and can be overcome by using

alternative methods such as combination antiviral therapy (CAT) via VAAs and broad-spectrum antiviral therapy (BSAT) ((Lazaro 2011, Martinez et al.2015).

CAT is known to be a successful strategy to reduce DRVM consisting of simultaneously giving the combination of several VAAs that target either treatment of infection or suppression of its symptoms (Martinez et al.2015). VAAs focus on the specific area of viruses in replication stages, and combined administration of anti-HCV protease and polymerase inhibitors for all chronic HCV treatment is the best example of this strategy (Martinez et al.2015). Likewise, highly active antiretroviral therapy (HAART) which is used for HIV treatment is another notable example. This therapy consists of the combination of one or two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and one non-nucleoside reverse transcriptase, or one protease inhibitor. The success of CAT strategies is considerable. Otherwise, there are still some ongoing unsolved issues in CAT that can particularly become in coinfections developing with main infections. These are comprised (i) the emergence of cross drug-resistance, that would reduce therapy efficiency, (ii) toxicity created by drug-drug interaction, (iii) poor treatment response, (iv) emergence of resistance against virus (Lazaro 2011, Martinez et al.2015).

LETHAL MUTAGENESIS

Researchers have demonstrated that developing drug resistance is a significant threat for future treatment of viral infections with antivirals, because the high error rates of RNA viruses provide them with great adaptability (Lazaro 2011). On the other hand, the consequences of this high error rate mean that RNA viruses are highly susceptible to mutations which cause deleterious effects on their fitness, leading to the extinction of virus populations (Arisa et al.2014). If the error threshold is crossed, the loss of virus infectivity that depends on the loss of genetic information would be inevitable (Lazaro 2011). These observations are incorporated into lethal mutagenesis (LM) proposed as a novel antiviral strategy which has recently begun to find favour amongst those looking into its clinical applications (Perales et al. 2011). The first time the term "lethal mutagenesis (LM)" was used by Loeb et al. (1999) in their article which had published the results of research on interactions between mutagenic pyrimidine analogue and HIV replication in cell culture (Perales et al. 2011). Following this research which had suggested the use of mutagenic agents anti-retroviral drugs, many studies have been performed. The important results obtained by studying of virus extinction with *in vitro* encouraged to create *in vivo* studies about LM. Firstly it has been reported that 5-Fluorouracil (5-FU), a nucleosid analogue, has positive effects on preventing persistent *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) infection in mice *in vivo* (Ruiz-Jarabo et al. 2003). Furthermore 5-FU is given to HIV patients in clinical trials and this is seen as a first encouraging step for clinical applications of LM (Mullins et al. 2011). Basically, LM was inspired by surpassing error threshold or transition into error catastrophe. If LM is evaluated in terms of targets and purposes, it can be seen that the target is the genetic information of virus using mutations to bring about a reduction in viral fitness. As a result of mutations, a virus can lose its genetic information when crossing an error threshold. The aim is to achieve a significant decrease in virus load, to limit virus viability or bring about viral extinction by increasing mutation rate of RNA viruses. Mutagenic nucleoside analogues (NAs), recommended for

treatment of various viral infections e.g *herpesvirus*, HCV, HBV and CCHFV, are incorporated into viral RNA genomes during RNA synthesis, resulting in a significant increase in the frequency of deleterious mutations of RNA viruses (Baskin et al. 2005, Bull et al. 2007, Igde and Yazici 2012, Khantun et al. 2015, Pauly and Laurings 2015). These compounds can cause a virus to cross an error threshold thought to be brought about by LM which exploits the high mutational rate and low mutational tolerance of many RNA viruses (Pauly and Laurings 2015). Depending on the consequence of increasing mutation rate, a virus escape would be significantly lessened by these compounds. Mutagenic NAs must have some particular characteristics, including the need not to be toxic for cells, to be specific for viral polymerases and also to be incorporated in the place of standard nucleotides in progeny viral RNA during replication (Ferrer-Ortega et al. 2010; Moreno et al. 2011; Perales et al.2011). Amongst mutagenic NAs, ribavirin is one of the best-known models which can cause the extinction of virus populations as reported in recent studies on HCV, *West Nile virus*, *Hantaan virus* and FMDV (Lazaro 2011, Moreno et al. 2011, Perales et al.2011). 5-FU and 5-Azacytidine (5-AZA) is another important mutagenic NA, whose LM effects were reported to have extinguished populations of FMDV (Sierra et al. 2010), LCMV (Grande-Perez et al. 2002) and HIV (Dapp et al. 2009).

CONCLUSION

Outcomes of research have shown that many viruses play an important role in the emergence of severe infectious disease. As a result of investigations aimed at increasing knowledge about viruses and pathogenesis, a large of number antiviral drug have been developed and presented for using the treatment from past until present. Currently, antivirals are widely used all over the world for the treatment of viral disease. However, the growing resistance to antivirals across the globe presents an increasing threat to the efficacy of available treatment for various viral infections such as HCV, HIV and others. Novel therapies for RNA viruses are urgently needed to counter the threat from increased antiviral drug resistance. Lethal mutagenesis is one of the important alternative strategies studied by researchers. It seems likely that, by using this lethal mutagenesis approach, a whole range of new antiviral strategies can be generated, and a greater understanding of viral population dynamics can be facilitated. Although the molecular mechanism leading to lethal mutagenesis is not fully understood, it is recommended that further investigation should be undertaken to discover or create new mutagenic agents. New antiviral protocols should also be designed with a view to decreasing viral load, facilitating clearance by the immune system, or eliminating viruses.

REFERENCES

- Arisa A, Thorne L, Goodfellow I (2014). Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication *in vivo*. *eLife*, 3: e03679, doi:10.7554/eLife.03679.
- Baskin H, Yazici Z, Baskin Y, Olgun N, Ozkul A, Bahar HI (2005). Effects of non toxic doses of acyclovir on nitric oxide and cellular death responses in herpesviruses type 1 and 2 infected HEp-2 cells. *New Microbiol*, 28, 205-213.
- Belshaw R, Gardner A, Rambaut A, Pybus OG (2008). Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends Ecol Evol*, 23, 188-193.
- Bull JJ, SanjuanR, Wilke CO (2007). Theory of Lethal Mutagenesis for Viruses. *J Virol*, 81, 2930-2939.
- Campagnola G, McDonald S, Beaucourt S, Vignuzzi M, Peersen OB (2014). Structure-function relationships underlying the replication fidelity of viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 89, 275-286.

- Costa L, Faustino MA, Neves MG, Cunha A, Almeida A (2012).** Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 4, 1034-1074.
- Dapp MJ, Clouser CL, Patterson S, Mansky LM (2009).** 5-Azacytidine can induce lethal mutagenesis in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 83, 11950-11958.
- Ferrer-Orta C, Sierra M, Agudo R, et al. (2010).** Structure of foot-and-mouth disease virus mutant polymerases with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol*, 84, 6188-6199.
- Graci JD, Cameron CE (2008).** Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol*, 3, 553-556.
- Grande-Pérez A, Sierra S, Castro MG, Domingo E, Lowenstein PR (2002).** Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci*, 99, 12938-12943.
- Igde M, Yazici Z (2012).** Possible antiviral activity of montelukast against herpes simplex virus type-1 and human adenovirus in vitro. *African J Microbiol Res*, 6, 197-202.
- Khatun A, Shabir N, Yoon K, Kim W (2015).** Effects of ribavirin on the replication and genetic stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus *BMC Vet Res*, 11, 21, 1-15 doi: 10.1186/s12917-015-0330-z.
- Lazaro E (2011).** RNA viruses: Control, mutagenesis and Extinction. *eLS*, doi 10.1002/980470015902.a0023276,2011.
- Lazaro E (2014).** RNA virus evolution at variable error rate. *Future Virol*, 9, 665-677.
- Loeb LA, Essigmann JM, Kazazi F, Zhang J, Rose KD, Mullins JI (1999).** Lethal mutagenesis of HIV with nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 1492-1497.
- Lou Z, Sun Y, Rao Z (2014).** Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol Sci*, 35, 86-102.
- Mack R (1970).** The great African cattle plague epidemic of the 1890's. *Trop Anim Health Prod*, 2, 210-219.
- Martinez JP, Sasse F, Bronstrup M, Diez J, Meyershans A (2015).** Antiviral drug discovery: broad spectrum drugs from nature. *Nat Prod Rep*, 32, 29-41.
- Meng T, Kwang J (2014).** Attenuation of human enterovirus 71 high-replication-fidelity variants in AG129 mice. *J Virol*, 88, 5803-5815.
- Moreno H, Gallego I, Sevilla N, de la Torre JC, Domingo E, Martín V (2011).** Ribavirin can be mutagenic for Arenaviruses. *J Virol*, 85, 7246-7225.
- Mullins JI, Heath L, Hughes JP et al. (2011).** Mutation of HIV-1 Genomes in a Clinical Population Treated with the Mutagenic Nucleoside KP1461. *PLoS ONE* 6(1): e15135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015135>
- Novella IS, Preloio JB, Taylor RT (2014).** RNA replication errors and the evolution of virus pathogenicity and virulence. *Curr Opin Virol*, 9, 143-147.
- Pauly MD, Lauring AS (2015).** Effective lethal mutagenesis of influenza virus three nucleoside analogs. *J Virol*, 89, 3584-3597.
- Perales C, Martín V, Domingo E (2011).** Lethal mutagenesis of viruses. *Curr Opin Virol*, 1, 419-422.
- Rozen-Gagnon K, Stapleford K, Mongelli V et al. (2014).** Alphavirus Mutator Variants Present Host-Specific Defects and Attenuation in Mammalian and Insect Models', *PLoS Pathogens*, 10: e1003877.
- Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, de la Torre JC (2003).** Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology*, 308, 37-47.
- Sierra S, Dávila M, Lowenstein PR, Domingo E (2010).** Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol*, 74, 8316-8323.
- Smith EC, Sexton NR, Denison MR (2014).** Thinking outside the triangle replication fidelity of the largest RNA viruses. *Ann Rev Virol*, 1, 111-132.
- Taubenberger JK, Morens DM (2006).** 1918 influenza: The mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*, 12, 15-22.
- WHO (2015).** Ebola situation report May 13, <http://apps.who.int/ebola/en/ebola-situation-reports>
- Xie X, Wang H, Zeng J, Li C, Zhou G, Yang D (2014).** Foot and mouth disease virus low-fidelity polymerase mutant polymerase mutants are attenuated. *Arch Virol*, 159, 2641-2650.
- Zeng J, Wang H, Xie X et. (2014).** Ribavirin-Resistant Variants of Foot-and-Mouth Disease Virus: the Effect of Restricted Quasispecies Diversity on Viral Virulence. *J Virol*, 88, 4008-4020.



VAN VETERINARY JOURNAL



Article Copyright Transfer Agreement Form

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

Title of the article:

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

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

Authorized Researcher

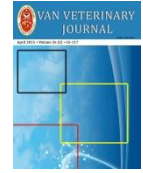
Title, Name-Surname :

Full Address :

e- mail :

Tel, Fax :

Date and Signature :



Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is Van Vet J.
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication.
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://vanvetderg.org> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures and graphs; original papers and reviews should not exceed 15 pages and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 1000 words. Summary should include **Aim, Material and Method, Results and Conclusion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system.
- 9- Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.
- 10- **Copyright Transfer Agreement Form** which automatically sends to the authors by the submission system after acceptance of the Paper should be signed and posted to the Editorial Office of the journal.
- 11- Apart from tables and graphs all visual elements (Photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **figure**. Tables and graphs are named as it is.
- 12- Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish and English** in the text.
- 13- Original research articles should be lined up as; **English Heading, Author(s) name, author(s) address, Summary and key words** and then **Turkish heading, summary and key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgement or information** (if there is) and **References**.
- 14- References should be listed according to authors surname alphabetically. In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Isleyici et al. 2015). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the [Web of Science](#). For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:
Articles:
Isleyici O, Sancak YC, Sancak H, Yucel UM (2015). Determination of aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. *Van Vet J*, 26 (3), 151-155.
Ekin IH, Gurturk K, Ilhan Z, Arabaci C, Gulaydin O (2015). Detection of enzyme activities and their relation to serotypes of bovine and human group B streptococci. *J Med Microbiol*, 64, 985-989
Books:
Marrow DA (1986). Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
Books chapters:
Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and Listeria monocytogenes. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.
Electronic Material: The name of the article and available web address and access date should be written.
Who (2006). Avian Influenza, February 2006, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/ Access date: 10 January 2009.
- 15- Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>).
- 16- Information about the publication expenses for accepted papers will be given to the author(s) after determining cost.
- 17- Copyright fee will not be paid to the author(s).

Correspondence: Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

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