

ISSN 1016-3573



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



# **ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ**

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY  
ANKARA – TURKEY

**Cilt/Volume 30 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2019**



---

**Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**  
**Journal of Etlik Veterinary Microbiology**

**Cilt/Volume 30 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2019**

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

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

Türkçe ve İngilizce / *Turkish and English*

ISSN 1016-3573

---

**Sahibi / Owner**

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına

*On behalf of the Veterinary Control Central Research Institute*

Dr. Cevdet Yaralı

Enstitü Müdür V. / *Director*

**Yayın Kurulu / Publication Board**

**Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor**

Özcan Yıldırım

**Editör / Editor in Chief**

Dr. Erdem Danyer

Dr. Selçuk Pekkaya

**Bilimsel Kurul / Editorial Board**

Dr. Erhan Akçay

Dr. Özlem Altıntaş

Dr. Ali Erkurt

Dr. Ufuk Erol

Uzm. Sabri Hacıoğlu

Uzm. Yusuf Ziya Kaplan

Uzm. Bahadır Kılınç

Çağla Korkmaz

Doç. Dr. Burhan Toprak

Neslihan Akbulut Tosun

Dr. Yeliz Yıkılmaz

**Adres / Address**

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

Tel. : +90 312 326 00 90 (8 hat)

Faks : +90 312 321 17 55

E-posta : [etlikdergi@tarimorman.gov.tr](mailto:etlikdergi@tarimorman.gov.tr)

İnternet adresi :

<https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez>

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd>

**Hakem Listesi / Reviewer List**

Doç.Dr. Eray ALÇIĞIR	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
Prof.Dr. Müjdat ALP	İstanbul-Cerrahpaşa Üniv. Vet. Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme Hast. AD.
Dr. Öğr. Üyesi Damla ARSLAN ACARÖZ	Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksek Okulu
Doç.Dr. Duygu BAKİ ACAR	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD.
Prof.Dr. Fikri BALTA	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar AD.
Prof.Dr. Tanay BİLAL	İstanbul-Cerrahpaşa Üniv. Vet. Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme Hast. AD.
Prof.Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç.Dr. Arzu FINDIK	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD
Doç.Dr. Elçin GÜNAYDIN	Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu
Dr. Öğr. Üyesi Hakan IŞIDAN	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç.Dr. Akın KIRBAŞ	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç hastalıkları AD.
Doç.Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç.Dr. Bekir OĞUZ	Van Yüzüncüyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Dr.Öğr. Üyesi Mustafa SENCER KARAGÜL	Kocaeli Üniversitesi Kartepe Atçılık Meslek Yüksekokulu
Doç.Dr. Murat ŞEFİK	Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç.Dr. Esra ŞEKER	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof.Dr. Nilgün ÜNAL	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Dr. Yeliz YIKILMAZ	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enst. Müd. Antraks Aşı Üretim Lab.
Prof.Dr. Murat YILDIRIM	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bakteriyooloji AD.
Prof.Dr. Şule YURDAGÜL ÖZSOY	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Patoloji AD.

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

ULAKBİM Yaşam Bilimleri, Türkiye Atf Dizini ve CAB Abstracts veritabanları kapsamında bulunan “en az çift hakemli” bir dergidir.

*This journal is evaluated by at least two double-blind reviewers and in the scope of ULAKBİM life sciences, Turkish citation index and CAB abstract databases and publishes scientific articles.*

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2019, Her hakkı saklıdır. / *All rights reserved.*

Basım Tarihi / *Publishing Date*: Aralık / *December* 2019, Baskı adedi / *Circulation*: 500

Tasarım ve Baskı / *Designed and Pressed by*



Medisan Yayinevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

## İçindekiler / Contents

### Araştırma Makalesi / Research Article

#### Investigation of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in Cattle in Adana Province by Serological and Molecular Methods

Adana İlinde Sığırlarda *Anaplasma marginale* ve *Anaplasma centrale*'nin Serolojik ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması

Tülin Güven Gökmen, Elçin Günaydın, Osman Sezer, Pınar Ayvazoğlu Demir, Armağan Erdem Ütük ... 109

#### A Serological Survey on Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) from Rainbow Trout in Turkey

Türkiye'deki Gökkuşuğu Alabalıklarında Enfeksiyöz Pankreas Nekrozu Virüsü (IPNV), Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) ve Enfeksiyöz Hematopoetik Nekroz Virüsü'nün (IHNV) Serolojik Olarak Araştırılması

Cüneyt Tamer, Yüksel Durmaz, Hasan Sercan Palancı, Emre Özan, Hamza Kadı, Zafer Yazıcı, Harun Albayrak..... 115

#### Aşılı Köpeklerin İdrarlarında *Leptospira* spp. Varlığının PCR Yöntemi ile Araştırılması

Investigation of the Presence of *Leptospira* spp. PCR in Urine Sample of Vaccinated Dogs

Özgür Akgül, Özer Akgül, Naciye Yakut Özgür..... 120

#### Koyunlarda Postpartum Dönemde Vaginal Svap Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ve Antibiyogram

Bacterial Isolation and Antibioqram from Vaginal Swap Samples during the Postpartum Period in Sheep

Ufuk Ülker, Mürşide Ayşe Demirel ..... 127

#### Samsun'da 2004-2019 Yılları Arasında İncelenen Köpek Meme Tümörleri

A Survey of Canine Mammary Tumors from 2004 to 2019 in Samsun

Nilüfer Kuruca, Mustafa Yavuz Gülbahar, Mahmut Sözmen, Murat Yarım, Yonca Betil Kabak, Efe Karaca, Sinem İnal, Tolga Güvenç..... 132

#### *Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum* için qPCR Tanı Kitinin Geliştirilmesi

Development of qPCR Diagnostic Kit for *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum*

Özlem Kardoğan, Özlem Şahan Yapıcıer, Kaan Müştak, İnci Başak Müştak, Arda Arman, Gültekin Ünal, Mustafa Kolukırık..... 137

#### Sıcaklık Stresi ile İndüklenen Broilerde Farklı Oranlarda Uygulanan Bitkisel Ekstraktların Bazı Kan Parametrelerine Etkisinin İncelenmesi

Investigation of the Effect of Vegetable Extracts on Some Blood Parameters in Broiler Exposed by Heat Stress

Bülent Bayraktar, Emre Tekce ..... 143

**Tavuk Dışkıları ve Çevresel Örneklerden *Salmonella* Infantis Fajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu**  
Isolation and Characterization of *Salmonella* Infantis Phages from Poultry Faces and Environmental Samples  
Ebru Torun, Hamit Kaan Müştak ..... 149

**Derleme / Review Article**

---

**Kanathı İntestinal Spiroketozis**

Avian Intestinal Spirochaetosis

Yavuz Çokal, Elçin Günaydın ..... 158

**Lumpy Skin Disease**

Lumpy Skin Disease

Arif Karaotçu, Yakup Yıldırım ..... 165

## Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Koşulları

1. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 pt, Times New Roman yazı karakterinde, iki yana yaslanmış düz metin olarak, tüm kenarlarda 25 mm boşluk bırakılarak ve tek aralıklı sayfa düzeninde A4 (210 × 297 mm) boyutunda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, olgu sunumlarında ve kısa bildirimlerde 6 ve editöre mektuplarda 4 sayfayı kaynaklar hariç geçmemesi istenir.

2. \*.doc ve \*.docx biçimindeki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki \*.jpeg veya \*.tiff biçimindeki şekillerin ve tabloların tamamı DergiPark üzerinden gönderilmelidir.

### Başvuru sırasında sunulacak dosyalar:

#### a. Başlık sayfası:

3. Yazı tipi (orijinal araştırma, güncel/davetli derleme, olgu sunumu, kısa bildirimler, editöre mektup) belirtilir.

4. Konuyu özetleyen kısa başlık yazılır. On kelimeyi geçmemesi önerilir.

5. Tüm yazarların adlarının ilk harfleri ve soyadlarının tümü büyük olacak şekilde yazıldıktan sonra üst simge ile numaralandırılarak çalıştıkları kurum ve adres bilgileri verilmelidir. Adreslerde şehir ve ülke adları belirtilmelidir. ORCID numarası verilmesi zorunlu değildir. ORCID numaraları harflerle belirtilerek adreslerden sonra yazılabilir.

6. Sorumlu yazar "\*" ile belirtilerek açık adres satırlarından sonra açık adres, telefon, e-posta bilgilerine yer verilmelidir. Kurum bilgileri birden başlayarak numaralandırılıp, adres, şehir, ülke bilgisi yazar isimleri altına eklenmelidir. Bu sayfada "sorumlu yazar" belirtilmeli isim, açık adres, telefon ve e-posta bilgileri eklenmelidir. Örnek olarak;

Farelerde Papilla Filiformislerin Işık ve Taramalı Elektron Mikroskopik Yapısı

Burhan Toprak<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Genetik Laboratuvarı, 06020, Ankara, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-1082-4559

\*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Ankara Tel: +903123254826

**Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler:** İlgili kararlara ilişkin bilgiler (Alındığı kuruluş, tarih ve sayı) bu başlık altında verilmelidir.

**Teşekkürler:** Kısmi başlık sayfasında yer almalıdır. Daha önce kongrelerde sunulan her çeşit bildirinin, başlık sayfasında kongre adı, yer ve tarih verilerek belirtilmelidir.

**Maddi destek ve çıkar ilişkisi:** Makale sonunda varsa çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi ve kuruluşlar ve varsa bu kuruluşların yazarlarla olan çıkar ilişkileri belirtilmelidir. (Olmaması durumu da "Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur" şeklinde yazılmalıdır.

#### b. Makalenin ana metni:

7. Başlık, özet ve en çok beşer adet anahtar kelime, Türkçe ve İngilizce olarak, ana metin ve kaynaklarla birlikte Başlık sayfasından ayrı bir dosya olarak sisteme yüklenmelidir.

8. Orijinal bilimsel araştırmalarda, olgu sunumlarında ve kısa bildirimlerde Türkçe ve İngilizce başlık, özet ve en az beş adet anahtar sözcük, giriş, gereç ve yöntem, bulgular, tartışma ve sonuç, kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. Olgu sunumlarında olgu geçmiş kısmı da oluşturulabilir.

9. Tablo ve şekiller hem ayrı olarak sisteme yüklenmeli hem de yazı içinde olması gereken yere yerleştirilmelidir.

10. Oluşturulan bu ana metin dosyasında kesinlikle yazar adı, kurum, e-posta bilgisi vb. detaylar olmaması gerekmektedir. Tüm satırlara sürekli olarak devam eden numara verilmelidir.

11. **Özet**, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde en fazla 250 sözcük olmalıdır.

12. **Anahtar kelimeler**, makale içeriğine uygun olarak seçilmeli, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve beş sözcüğü geçmemelidir.

13. **Giriş**, konu ile ilgili özet literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalıdır.

14. **Gereç ve Yöntem**, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. İstenilirse alt başlık kullanılabilir. Alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir. (Ekstraksiyon işlemi, İstatiksel yöntem, Deney deseni vb.)

15. **Bulgular**, bölümünde veriler, tekrarlamaya yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Bulgular tablo ve şekillerle desteklenerek kısa olarak sunulmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil ve grafik başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir. Tablo ve şekillerin kodlanması nümerik veya alfa nümerik sembollerle gösterilmelidir.

16. **Tartışma ve Sonuç** bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmaların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı belirtilmelidir.

17. **Kaynaklar**, kaynaklar listesi soyadına göre alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı ve yayın tarihi yazılarak Toprak (2006); Toprak ve Erol (2007); Toprak ve ark. (2008); Toprak (2012, 2013) cümle sonunda ise sadece parantez içerisinde yazar soyadı ve yayın tarihi noktalama işaretinden önce yazılmalıdır (Toprak 2006; Toprak ve Toprak 2007; Toprak ve ark. 2008; Toprak 2012, 2013); Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynaklar tarih sırasına göre küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kaynak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." kısaltması ile belirtilmelidir. Yazılarda ve yerine & işareti kullanılmamalıdır.

18. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde ibare koyularak belirtilmelidir.

19. Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

#### Sürelî Yayın:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. (1992). Induced transplacental transmission of *N. Caninum* in cattle. *J Am Vet Med Ass.* 201, 709-713.

#### Yazarlı Kitap:

Fleiss JI. (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

#### Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KJ, eds.. (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

#### Editörlü Kitapta Bölüm:

Bahk J, Marth EH. (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. *Foodborne Disease*. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

#### Kongre Bildirileri:

Çetindağ M. (1994). *Pronoprymna ventricosa*, a new digenic trematode from the *Alosa fallax* in Turkey. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, İzmir-Turkey.

**Tezler:**

Aksoy E. (1997). Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immunoperoksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

**Anonim:**

Resmi kuruluşlar (Tarım ve Orman Bakanlığı, OIE, FAO vb.) internet sitesi harici kaynakların kullanımı önerilmez. Anonim. (2009). Contagious equine metritis. Erişim adresi: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf>, Erişim tarihi: 17.10.2009.

Peter AT (2009). Abortions in dairy cows. Erişim adresi: <http://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm>, Erişim tarihi: 14.11.2009.

20. Kaynakların sonuna mevcut ise doi numarası yazılmalıdır.

c. **Tam makale:** Başlık ve ana metin içeriğinin birleştirilmesiyle oluşturulan tam yazı \*.pdf dosyası olarak sisteme yüklenmelidir.

21. Kaynaklar alfabetik olarak sıralandıktan sonra ayrıca numaralandırmaya gerek yoktur.

22. Simgelerin kullanımına dikkat edilmelidir. Örnek olarak çarpma işareti olarak "x" yerine "×" kullanılmalıdır.

23. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır (*Monachus monachus*, *Anisakis* sp.). Tüm ölçüler SI'e (Système Internationale) göre verilmelidir.

24. Deneylerde kullanılan kimyasal, kit vb. gereçlerin marka, model, üretim yeri bilgileri yer almalıdır. Örnek: Blu-T4 ETVAC aşısı (Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye).

25. Başlık sayfası, makalenin ana metni ve tam makale olmak üzere üç dosya başvuruda bulunmalıdır.

26. Yayınlanması uygun görülen çalışmaların basılmasına ilişkin karar yazar(lar)ına bildirilir.

27. Türkçe yazılar hazırlanırken dil ve kelime bilgisi kuralları için Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı kaynaklar esas alınmalıdır.

28. Dergiye gönderilen yazılar kabul tarihine göre yayınlanır. Dergi gerekli gördüğü durumlarda sıralamayı değiştirme hakkını saklı tutar.

**Yayın, Hakemeleme, Etik İlkeleri ve Yasal Sorumluluklar**

Bu dergi öncelikli olarak bakteriyoloji, parazitoloji, viroloji, halk sağlığı, epidemiyoloji, aşı üretimi, laboratuvar kalite yönetim sistemleri olmak üzere, diğer tüm veteriner bilim alanlarını kapsamaktadır. Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi araştırma ve yayın etiği standartlarına bağlıdır. İntihal tespit edilmesi kabulden sonra bile bir yazının reddedilmesine neden olabilir. Editörler, herhangi bir etik suistimal şüphesinde, ilgili uluslararası yayın ve araştırma etiği kurallarına (COPE guidelines, Cse White Paper on Publication Ethics, ORI) uygun olarak hareket eder. Dergimizde yayınlanması için gönderilen bilimsel çalışmaların European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik hükümlerine uygun olarak yapıldığını, gerekli tüm kurumsal etik ve yasal izinlerin alındığını varsayarak, bu konuda dergi yönetimi olarak sorumluluk kabul etmemektedir. Çalışmada "Hayvan" ögesi kullanılmış ise yazarlar, yazının Gereç ve Yöntem bölümünde çalışmalarında hayvan haklarını koruduklarını ve ilgili etik kuruldandan onay aldıklarını belirtmek zorundadır. Dergimiz gönderilen bilimsel çalışmalarda European consensus-platform for alternatives stratejilerine uygun olarak deney hayvanlarının kullanımında 3R (Replacement, Reduction ve Refinement) kuralına uygun davranılmasını bekler ve destekler. Farklı etik kurul onayı ya da izin alması

(Örneğin klinik araştırmalar etik kurul onayı gibi) değerlendirme süresince fark edilen yazıların değerlendirmesine ara verilerek gerekli izinleri alması için sorumlu yazar uyarılır, gerekli izinlerin tamamlanmasından sonra yayın sürecine devam edilir. Söz konusu onay bilgileri gereç ve yöntem kısmına eklenir. Çalışmalarla ilgili uluslararası ve ulusal düzenlemeler çerçevesinde gerekli kurum ve kuruluşlardan alınması gereken tüm izinlerin (Örneğin yaban hayatına yönelik çalışma izin belgesi gibi) alınarak çalışmaya başlanması yazarların sorumluluğundadır. Dergi bu konuda sorumlu tutulamaz. Yazının sorumlu yazarı tarafından sistem aracılığıyla gönderilmesi ile yazının bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayınlanmadığı ve aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığı şeklinde değerlendirilir. Tüm yazarlar yayın içeriği ve hakkında hem fikir olduklarını beyan etmiş sayılırlar. Maddi destek ve çıkar ilişkisi durumu ayrıca başvuru sırasında editöre bildirilmelidir. Yazıların Türkçe ve İngilizce tam metinlerinin gönderilmesi ve yayına kabul edilmesi halinde tek bir yazı olarak kabul edilerek sırasıyla Türkçesi ve İngilizcesi yayınlanır. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu (etik, bilimsel, yasal, vb.) yazarlara aittir. Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazılar tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ile dergiye gönderilir.

Etik Veteriner Mikrobiyoloji dergisi açık erişimi desteklemektedir. Yayınlanmak üzere kabul edilen yazıların her türlü yayın hakkı yayıncıya aittir. Ancak yazarlar "Eğitim amaçlı, kendi kişisel kullanım hakkı, Makalenin tümünü veya bir kısmını bir toplantıda veya konferansta kullanma, Makalenin tümünü veya bir kısmını bir toplantıda veya konferansta kullanma, Çalışmalarını çevrimiçi olarak kurumsal depolarda veya internet sitelerinde yayınlama, Makalelerinin görünürlüğünü arttırmak için herhangi bir sosyal medya platformu kullanma, Makalede açıklanan herhangi bir işlem veya prosedür için patent ve ticari marka haklarını saklı tutar. Yayınlanması uygun görülen çalışmaların basılmasına ilişkin karar yazar(lar)ına bildirilir. Türkçe yazılar hazırlanırken dil ve kelime bilgisi kuralları için Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı kaynaklar esas alınmalıdır. Dergiye gönderilen yazılar kabul tarihine göre yayınlanır. Dergi gerekli gördüğü durumlarda sıralamayı değiştirme hakkını saklı tutar. Yazıların basım işleri ve yayınlanması için herhangi bir ücret talep edilmez. Yazarlara da yazıların basılması karşılığında herhangi bir ödeme yapılmaz. Yayınlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez. Gönderilen makalelere ilişkin İtirazda veya şikâyette bulunmak isteyen yazarlar, ilk olarak, sorumlu yazı işleri müdürüne bir itiraz mektubu göndermelidir. Mektupta, itiraz veya şikâyet konusu hakkında ayrıntılı bilgi verilmelidir. Böyle bir durumda, sorumlu yazı işleri müdürü konuyu en kısa sürede incelemesi için editör veya yayın kurulu üyelerinden birini görevlendirir. Gerekirse, sorunu araştırmak için arabulucu olarak harici bir uzman atanabilir. Ancak sorumlu yazı işleri müdürü, tüm temyiz ve şikâyetler için karar verme sürecindeki nihai otoritedir. Dergi, itiraz ve şikâyetlerini incelerken COPE kurallarına uyar. Yayın hakkı devri sözleşmesine buradan ulaşabilirsiniz.

**Tarihçe ve Arşiv**

1960-1976 yılları arasında Etik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi,

1977-1986 yılları arasında Etik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi,

1987 yılından günümüze kadar Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi adıyla yayımlanmıştır.



## Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. Manuscripts in Turkish and English languages should be written as a justified text leaving 25 mm from all margins, in 12pt Times New Roman text character, in single-spaced page format and A4 (210 × 297 mm) size. All manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for scientific articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and short communications and 4 pages for letters to the editor except references.

2. The manuscripts in \*.doc or \*.docx formats and figures of maximum 300dpi resolution in \*.jpeg or \*.tiff formats and tables should be sent via DergiPark.

### Three files to be submitted during the Application

#### a. Title Page

3. Type of manuscript (original research, up-to-date/invited review, case report, short communication, letter to the editor) is indicated.

4. Title summarizing the subject is written. It is suggested not to exceed 10 words.

5. After the first letter of names and all letters of surname of authors are written in capital letters, institutions and addresses of authors should be written via enumerating the names by superscripts. Names of cities and countries should be indicated in addresses. ORCID number submission is not obligatory. ORCID numbers can be written after addresses with an indication of letters.

6. The responsible author should be indicated with “\*” and after address lines, full address, e-mail, and phone number should be added. Institution information should be enumerated starting with 1 and address, name of city and country should be added under authors' names. Example:

The Structure of Papilla Filliforms in Mice Under Light and  
Scanned Electron Microscope  
Burhan Toprak<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Veterinary Control Central Research Institute, Laboratory of Genetics, 06020, Ankara, Turkey

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-1082-4559

\*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Phone: +903123254826

**Use of laboratory animals Ethics Committee and other decisions of Ethics Committee and Permissions:** Information about related decisions (Issue of institution, date, and number) should be given under this title.

**Acknowledgment:** This part should take place in the title page. All communications presented in congresses earlier should be indicated in title page with name, place, and date of congress.

**Financial Support and Conflict of interest:** All persons and institutions in support of finance and, if any, conflict of interest with authors should be disclosed at the end of the article. In case of no conflict of interest, it should be stated as “There is no person/institution funding the work and authors have no conflicts of interest.”

#### b. The main text of Article

7. Title, abstract and up to five keywords should be uploaded in both Turkish and English. They should also be uploaded to the system with the main text and resources, but as a separate file from the title page. For non-Turkish language speakers, a Turkish language title, summary and keywords will be written by the editorial staff.

8. In original scientific research, case reports and short reports should be prepared according to the following range. Turkish and English titles, abstracts, at least five keywords, introduction, materials and methods, findings, discussion and conclusions and references.

9. Tables and figures should be separately uploaded to the system and also placed where they should be in the text.

10. Name of the author, institution, e-mail information and so on. details don't should be In this main text file. All lines should be numbered continuously.

11. **The summary** should briefly describe the results and conclusion, less than 250 words.

12. **Five keywords** should be selected from Medical Subject Headings, should be written in alphabetical order.

13. **The introduction** should include summary literature relaventing subject of the article and the purpose of the study should be emphasized in the last paragraph.

14. **Materials and methods** should be written in a comprehensible way and be aware giving details. Subtitle can be used if desired. Subtitles must be defined in italic font. (Extraction process, Statistical method, Experimental design, etc.)

15. **In the findings**, the data should be clearly indicated without repetition. Findings should be supported by tables and figures and presented briefly. Table headings should be indicated above the table and figure and graphic headings should be given below the figure. The coding of tables and figures should be indicated by numeric or alpha-numeric symbols.

16. **In the Discussion and Conclusion**, the findings obtained from the research should be compared with the findings of other researchers and their contribution to the literature should be specified.

17. **References** should be listed and numbered alphabetically and chronologically according to the surnames. References in the text should be written as author surname and date of publication, for example, Toprak (2006); Toprak and Erol (2007); Toprak et al. (2008); Toprak (2012, 2013). If the references are at the end of the sentence, references should be written only in parenthesis as the surname of the author and date of publication and the surname of the author and the date of publication should be also written before the punctuation mark. For example (Soil 2006; Soil and Soil 2007; Soil et al. 2008; Soil 2012, 2013); If more than one reference is to be given at the end of the sentence, the references should be ordered from small to large in order of date. “&” mark should not be used instead of “and”.

18. Abbreviations of journals should be made based on the last edition of “Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation”. In the list of references, if the author has more than one publication of the same year, it should be indicated with “a” and “b next to the publication date.

19. Reference writing and ranking should be done as follows;

#### For articles:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. (1992). Induced transplacental transmission of *N. caninum* in cattle. *J Am Vet Med Ass.* 201, 709-713.

#### For books:

Fleiss JI. (1981). *Statistical methods for rates and proportions.* Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

#### For edited books:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds.. (1990). *Manual of Clinical Microbiology.* Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

#### For the chapter in edited books:

Bahk J, Marth EH. (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes.* Cliver DD. eds. *Foodborne Disease.* Academic Press Inc, San Diego. p.248-256

**For congress papers:**

Çetindağ M. (1994). *Pronoprymna ventricosa*, a new digenic trematoda from the *Alosa fallax* in Turkey. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

**For dissertations:**

Aksoy E. (1997). Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmunoperoksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar. Ph.D. Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara

**Anonymous:**

It is not recommended to use other internet sites other out of website of the official institutions (Ministry of Agriculture and Forestry, OIE, FAO, etc.). Anonymous. (2009). Contagious equine metritis. Access address: HTTP://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf, Date of access: 17.10.2009.

Peter AT (2009). Abortions in dairy cows. Access address: HTTP://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm, Date of access: 14.11.2009.

20. If doi number available, Doi number should be written at the end of the references.

**c. Full article:** Full text created by combining title and main text content should be uploaded to the system as \*.pdf file.

21. If the references are ranked alphabetically, there is no need to renumber them.

22. It should be attention to the use of symbols. For example, as multiplication sign, "x" should be used instead of "×".

23. Latin genus and species names should be written in italics (*Monachus monachus*, *Anisakis sp.*). All dimensions should be given according to SI (Système Internationale).

24. The brand, model and production place information of the chemical and kit used in the experiments should be written. Example: Blu-T4 ETVAC vaccine (Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara, Turkey).

25. It should be applied with three files consisting of the title page, the main text of the article, and the full article.

26. The decision to publish works that are deemed appropriate to publish shall be notified to the author(s).

27. When writing articles in Turkish, the vocabulary rules should be based on the sources prepared by the Turkish Language Association.

28. Articles sent to the journal are published according to the date of acceptance. The journal may change the publishing rank when it deems necessary.

**Publication, Arbitration, Ethical Principles, and Legal Responsibilities**

This journal covers primarily bacteriology, parasitology, virology, public health, epidemiology, vaccine production, laboratory quality management systems, and all other veterinary sciences.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is subject to research and publication ethics standards. Plagiarism can lead to rejection of an article even after acceptance. The editors act in accordance with the relevant international publication and research ethics rules (COPE guidelines, CSI White Paper on Publication Ethics, ORI) in case of any ethical misuse. Assuming that the scientific studies submitted for publication in our journal are carried out in accordance with the provisions of the Regulation on Welfare and Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes with European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, and that all necessary institutional ethics and legal permissions are taken, the journal management does not accept responsibility as a matter of responsibility. If the "Animal" element is used in the study, the authors must state that they protect animal rights in their studies and that they have taken approval from the relevant ethics committee. Our journal expects and supports the compliance of 3R (Replacement, Reduction, and Refinement) rules in the use of experimental animals in accordance with the European consensus-platform for alternatives strategies in scientific studies.

Approval of different ethics committee or permission (for example, clinical research ethics committee approval) during the evaluation of the discontinuation of the review of the articles that are required to receive the necessary authorizations are warned, the publication process is continued after the necessary permissions are completed. The approval information should be added to the material and method section.

It is the authors' responsibility to ensure that all permits (such as work permits for wildlife) are obtained from the relevant institutions and organizations in accordance with international and national regulations. The journal cannot be held responsible for this matter.

**History and Archive**

Journal was published between 1960-1976 as Journal of Etlik Veterinary Bacteriology Institute,

Between 1977-1986 as Journal of Etlik Veterinary Microbiology Institute Dergisi,

From starting 1987 till today as Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

## Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi\*

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen yazının;

### Başlığı:

1. Yazar(lar) olarak, yazım(ız)ın orijinal olduğunu, değerlendirilmek üzere eşzamanlı olarak başka bir dergiye sunulmadığını, halen başka bir dergide değerlendirme aşamasında olmadığını, bildiri özeti olmak dışında daha önce başka bir dergide yayınlanmadığını, bilimsel ve etik sorumluluğunun tarafım(ız)a ait olduğunu, diğer yazarlara ulaşılamaması halinde, tüm yazarların bu başvurudan haberdar olduklarını ve tüm yazarların araştırmanın her sürecine aktif katıldıklarını beyan ederim(z).
2. Yapılan çalışmanın derginin yayın kurallarında belirtilen tüm etik değerleri ve kuralları gözeterek, toplumu, herhangi bir kurumu ya da kişiyi rencide edici herhangi bir şekilde yapılmadığını, deney hayvanlarının kullanımında etik kurallarına uyulması için gerekli özenin gösterildiğini, dergi sahibi, sorumlu yazı işleri müdürü, editörü ve yayın kurulunun yapılan çalışmadan ve yazıdan dolayı doğabilecek tüm hukuki işlemlerde sorumluluk taşımadığını kabul ederim(z).
3. Yazım(ız)ın yayınlanmak üzere kabul edilmesi halinde, gerekli görülen düzeltmelerle birlikte, derginizin belirttiği tüm yazım basılı ve elektronik olarak yayın kurallarına uygun basılması, çoğaltılması, dağıtılması gibi tüm haklarını yayın kurallarında belirtilen diğer haklarım(ız) saklı kalmak koşuluyla Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devrettiğimizi gayri kabili rücu olarak kabul ederim(z).

Yazar Adı ve Soyadı**	Sorumlu Yazar	İmza	Tarih/Yer

\*Yazının yayınlanmak üzere Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne kabul edilmemesi durumunda bu sözleşme geçersizdir. Sözleşmenin bağımsız kopyaları farklı kuruluşlarda çalışan yazarlar tarafından ıslak olarak imzalanarak ayrı ayrı sisteme yüklenebilir. İmzalar özgün olmalıdır.

\*\*Yazarlar yazıda belirtildiği gibi sıralanmalıdır.

**Sorumlu Yazara ait telefon ve yazışma adresi:**

### Journal of Etlik Veterinary Microbiology Copyright Release Form\*

Author(s) of the manuscript of which title and authors are undermentioned declare(s) that

**Title:**

1. The manuscript is original and has not been submitted or considered for publication elsewhere, is not published elsewhere except in the form of abstract, and scientific and ethical responsibility belong(s) to me/us. In case all authors are not reached, all authors have been informed of the application and all authors have participated in the work process actively.
2. The work has been performed in consideration of ethical values and rules of the journal indicated in the publication rules; has been performed in a way not to offend any society, foundation or person and special care are shown to comply with ethical rules during animal testing. The owner of the journal, editor in chief, the editorial board are not responsible for the legal acts generated from the work and the manuscript.
3. In case of acceptance for publication of the manuscript, with the corrections considered necessary I/ we hereby grant the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, without recourse, the right to publish, distribute, reproduce the manuscript according to your Journal's all printing and electronic printing rules reserving the other rights indicated in the publication rules.

Full Name of the Author**	Corresponding Author	Signature	Date/Place

\*The contract is invalid in case the submitted manuscript is not accepted. Independent copies of the contract can be ink signed by the authors working in different institutions and be uploaded separately.

\*\*Authors' name must be in order as they are in the manuscript.

**Contact Number and Address of the Corresponding Author:**

## Investigation of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in Cattle in Adana Province by Serological and Molecular Methods

Tülin Güven Gökmen<sup>1</sup>, Elçin Günaydın<sup>2</sup>, Osman Sezer<sup>3</sup>,  
Pınar Ayvazoğlu Demir<sup>4</sup>, Armağan Erdem Ütük<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Çukurova University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Adana, Turkey

<sup>2</sup>University of Hitit, Alaca Avni Çelik Vocational School, Çorum, Turkey

<sup>3</sup>Adana Veterinary Control Institute, Parasitology Laboratory, Adana, Turkey

<sup>4</sup>Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Livestock Economics, Kars, Turkey

<sup>5</sup>Çukurova University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Adana, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 10.10.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 12.11.2019

**Abstract:** Anaplasmosis is a common disease in tropical and subtropical climate zone and is transmitted by vectors. Especially in large cattle management systems, it has started to be detected frequently in recent years. The aim of this study was to determine the prevalence of *Anaplasma* spp. in cattle in Adana province. For this aim, 187 blood samples were collected from cattle from fifteen districts of Adana that have different climatic zones and examined by Competitive ELISA (cELISA) and Nested-PCR methods. Seropositivity was determined as 38.5% (72/187) in cattle. The molecular prevalence was detected as 1.6% (3/187) for *Anaplasma centrale* and 3.2% (6/187) for *Anaplasma marginale* by Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) methods. In this study, epidemiological data related to bovine anaplasmosis in Adana province of Turkey were discussed in detail and it was thought that the obtained data would contribute to disease prevention and control programs.

**Key words:** *A. centrale*, *A. marginale*, cELISA, Nested-PCR, Adana

### Adana İlinde Sığırlarda *Anaplasma marginale* ve *Anaplasma centrale*'nin Serolojik ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması

**Özet:** Anaplazmozis tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde vektörler tarafından taşınan yaygın bir hastalıktır. Özellikle büyükbaş hayvancılık işletmelerinde son yıllarda sık tespit edilmeye başlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, Adana ilindeki sığırlarda *Anaplasma* spp. prevalansını belirlemektir. Bu amaçla Adana'nın farklı iklim bölgelerine sahip on beş ilçesinde sığırlardan 187 kan örneği alınarak kompetitif ELISA (cELISA) ve Nested-PCR yöntemleriyle incelenmiştir. Sığırlarda seropozitiflik %38,5 (72/187) olarak belirlenmiştir. Ayrıca moleküler prevalans, Nested-PCR yöntemleriyle *Anaplasma centrale* için %1,6 (3/187), *Anaplasma marginale* için %3,2 (6/187) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'nin Adana ilinde sığır anaplazmozisi ile ilgili epidemiyolojik verileri ayrıntılı bir şekilde ele alınmış ve elde edilen verilerin hastalığın önlenmesine ve kontrol programlarına katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *A. centrale*, *A. marginale*, cELISA, Nested-PCR, Adana

### Introduction

Anaplasmosis is a subclinical disease in animals and causes economic losses such as increase in cull rate, reduction in calf crop and mortality rate (Zabel et al. 2018). *Anaplasma* spp. have a wide range of hosts such as cattle, sheep, goats, wild ruminants, horses, mice, dogs, cats and transmitted by ticks or mechanical vectors (ear taggers, biting flies, surgical instruments and contaminated needles) and rarely transplacentally (Radostits et al. 2007; Kocan et al. 2010; Aubry et al. 2011). *Anaplasma* spp. can survive intracellularly within different cells as erythro-

cytes, monocyte, granulocyte and endothelial cells (Rar et al. 2011; Kocan et al. 2015)

The most common agents of anaplasmosis in cattle are *A. marginale*, followed by *A. centrale*, *A. bovis* and *A. phagocytophylum*. The hosts of *A. marginale* and *A. centrale* are cattle and wild ruminants and these agents infect erythrocytes. Competitive Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (cELISA), polymerase chain reaction (PCR) is commonly used for infection detection. The advantage of PCR is early detection during the pre-patent period and identification of an "active" infection at a single time-point. The utility of PCR is widespread and can be



combined with the cELISA for thorough diagnosis of *Anaplasma* infection (Hairgrove et al. 2015). In this study, it was aimed to detect the prevalence of *A. marginale* and *A. centrale*, in cattle by molecular and serological methods in Adana.

## Materials and Methods

### Sampling

Blood samples were collected from 187 clinically healthy cattle (168 female and 19 male) in 15 districts (Çukurova, Seyhan, Ceyhan, Yumurtalık, Karaisalı, Kadirli, Kozan, İmamoğlu, Saimbeyli, Tufanbeyli, Pozantı, Feke, Karataş, Yüreğir and Aladağ) of Adana from June to September 2017. An information form which includes age, breed, gender of each cattle and altitudes of districts was prepared. Collected blood samples were stored at -20°C until used for serologic and molecular diagnosis.

### Sample Analysis

In this study, 187 sera samples were investigated by the c-ELISA method for the detection of anti-*Anaplasma* spp. antibodies. Sera samples were analyzed by *Anaplasma* antibody test kit (cELISA; VMRD Inc., Pullman, WA) for *A. marginale*, *A. ovis*, and *A. centrale* and cELISA kit was used according to the instructions of the manufacturer. The optical density (OD) of each well was measured at a wavelength of 620 nm.

Besides, a nested-PCR methods was used for the diagnosis of *A. marginale* and *A. centrale*. Blood samples was extracted with QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Extracted DNA samples were used as a template for *A. centrale* and *A. marginale* in species-specific nested-PCR reaction according to a previously described protocols (Kawahara et al. 2006; Molad et al. 2006) and Pearson's Chi-square tests were performed by SPSS 22.0 package software. P value of <0.05 was considered as statistically significant.

## Results

At the end of the study, *Anaplasma* spp. seropositivity was detected by c-ELISA method as 38.5% (72/187) in Adana. Sixty-nine (95.8%) of the seropositive animals were female and 3 (4.2%) were male and they were belonged to Holstein, Crossbred, Simmental, Local, Jersey, Brown Swiss and Aberdeen breeds. According to age ranges, se-

ropositivity (63.6% -21/33) was highest in the 7-13 over age group (Table 1).

**Table 1.** Seropositivity distribution according to breed, age and gender in cattle

	Seropositivity	Total
<b>Age</b>		
0-3	22 (29.3%)	75
4-6	29 (36.7%)	79
7-13	21 (63.6%)	33
<b>Gender</b>		
Female	69 (41.07%)	168
Male	3 (15.78%)	19
<b>Breed</b>		
Holstein	50 (35.46%)	141
Crossbred	14 (48.27%)	29
Simmental	3 (100%)	3
Local	2 (25%)	8
Jersey	1(100%)	1
Brown Swiss	1(50%)	2
Aberdeen	1(50%)	2
Anatolian Grey	-	1
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>187</b>

The highest seropositivity was observed in Çukurova (91.6% - 11/12) and Karataş (91.6% -11/12), followed by Seyhan (80% - 8/10) and Saimbeyli districts (60% - 6/10), respectively. *Anaplasma* spp. seropositivity was not found in Yumurtalık districts (Table 2).

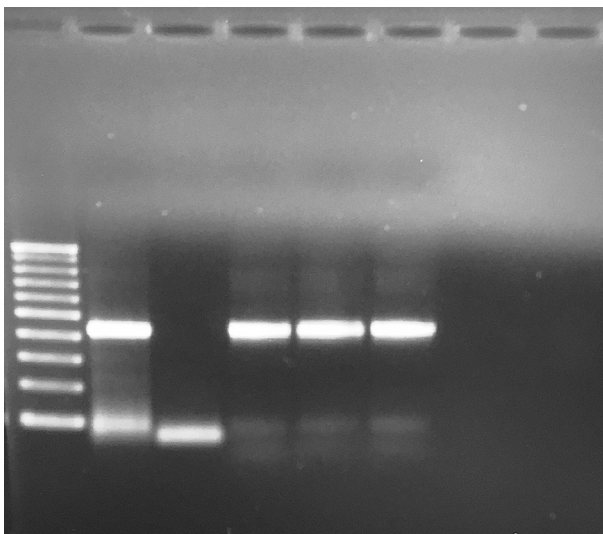
**Table 2.** Seropositivity distribution in districts of Adana.

Districts	<i>Anaplasma</i> spp. Seropositive Sample Size	Total Sample Size
Çukurova (150m)	11(%91.6)	12
Karataş (10m)	11(%91.6)	12
Seyhan (30m)	8(%80)	10
Saimbeyli (945m)	6(%60)	10
Yüreğir (20m)	5(%50)	10
Tufanbeyli (1472m)	11(%44)	25
Karaisalı (300m)	4(%40)	10
Pozantı (790m)	3(%30)	10
Sarıçam (100m)	3(%30)	10
Ceyhan (25m)	3(%25)	12
Kozan (150m)	2(%8.3)	24
Aladağ (860m)	2(%20)	10
Feke (560m)	2(%20)	10
İmamoğlu (84m)	1(%10)	10
Yumurtalık (20m)	-	12
<b>Total</b>	<b>72 (%38.5)</b>	<b>187</b>

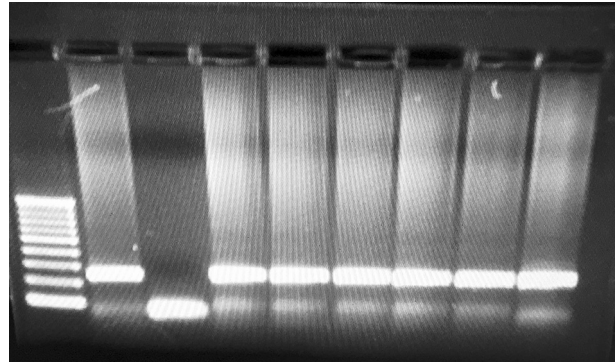
The molecular prevalence was detected as 1.6% (3/187) for *A. centrale* and 3.2% (6/187) for *A. marginale* by Nested-PCR methods. While *A. marginale* was determined in Tufanbeyli and Karataş, *A. centrale* was detected in Cukurova and Aladağ districts. All PCR-positive cattle were female. The cattle infected *A. centrale* were Holstein and were 3, 6 and 8 years old, respectively. Also, the cattle infected *A. marginale* were Crossbred, Simmental and Holstein and were 3, 4, 8, 10 and 13 years old (Table 3).

**Table 3.** Distribution of *Anaplasma* spp. in districts of Adana.

	Districts	Breed	Gender	Age	Total Cattle Number
<i>marginale</i>	Tufanbeyli	Crossbred	Female	8	6
		Simmental	Female	10	
		Crossbred	Female	13	
		Simmental	Female	3	
		Holstein	Female	3	
	Karataş	Holstein	Female	4	
<i>centrale</i>	Cukurova	Holstein	Female	8	3
		Holstein	Female	6	
		Aladağ	Holstein	Female	



**Figure 1.** *Anaplasma centrale* Nested-PCR (426 bp). Lane 1: 100bp DNA ladder, Lane 2: Positive control, Lane 3: Negative control, Lane 4-6: Positive samples.



**Figure 2.** *Anaplasma marginale* Nested-PCR (246 bp). Lane 1: 100bp DNA ladder, Lane 2: Positive control, Lane 3: Negative control, Lane 4-9: Positive samples.

### Statistical Analysis

**Table 4.** Statistically analysis between *Anaplasma* spp. seroprevalence and breed, gender, age and altitude

Parameters	<i>Anaplasma</i> spp.		Total	P value/X <sup>2</sup>	
	Negative	Positive			
Altitude	<100 m	45	31	76	X <sup>2</sup> =0.283 p=0.595 p>0.05
		59.2%	40.8%	100.0%	
	>100 m	70	41	111	
		63.1%	36.9%	100.0%	
Total	115	72	187		
		61,5%	38,5%	100,0%	
Breeds	Holstein	91	50	141	X <sup>2</sup> =2.240 p=0.135
		64,5%	35,5%	100,0%	
	Others	24	22	46	
		52,2%	47,8%	100,0%	
Total	115	72	187		
		61,5%	38,5%	100,0%	
Gender	Female	99	69	168	X <sup>2</sup> =4.608 p=0.032
		58.9%	41.1%	100.0%	
	Male	16	3	19	
		84.2%	15.8%	100.0%	
Total	115	72	187		
		61.5%	38.5%	100.0%	
Age	0-3 age	53	22	75	X <sup>2</sup> =11.574 p=0.003
		70.7%	29.3%	100.0%	
	4-6 age	50	29	79	
		63.3%	36.7%	100.0%	
	7 over age	12	21	33	
Total	115	72	187		
		61.5%	38.5%	100.0%	

In this study, the relationship between *Anaplasma* spp. seroprevalence and gender, breed, age and altitude were statistically analyzed (Table 4). In the analysis, no significant difference was found between altitude, cattle breeds and *Anaplasma* spp. ( $p > 0.05$ ). While a statistically significant relationship was found between gender, age and the rate of *Anaplasma* spp. seroprevalence. The seroprevalence was higher than males ( $p < 0.05$ ) and in cattles over the age of seven ( $p < 0.01$ ).

## Discussion and Conclusion

For the detection of *Anaplasma* infections, conventional, serological and molecular methods are used alone or with in combination. Although microscopic examination is one of the most cost-effective and easiest way, it has low sensitivity and specificity. The serological methods as Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), ELISA and Complement Fixation (CF) are generally used to detect the presence of specific antibodies. One of these methods, the cELISA test, has a very high sensitivity and specificity due to the presence of the ANAF16C1 monoclonal antibody, which recognizes the preserved antigen Major Surface Protein (MSP)-5. The gold standard for the diagnosis of anaplasmosis is combination of c-ELISA and microscopic examination. PCR, which is the most commonly used molecular method, is highly sensitive, specific and can easily distinguish the types and subspecies of *Anaplasma* species. Furthermore, it is also superior to other methods for detecting coinfections (Shabana et al. 2018). In this study, we used c-ELISA and PCR methods together.

In Turkey, many studies have been conducted to determine the anti-*A. marginale* antibodies with c-ELISA method and seroprevalence rates were determined as, 55.35% (357/645) in the Interior Aegean region (Birdane et al. 2006), 52.1% (98/188) in Kars (Gökçe et al. 2013), 45.9% (28/61) in Bursa (Selçuk et al. 2015), 37.8% (102/270) in the Black Sea region (Açııcı et al. 2016), 31.86% (223/700) in Konya (Işık et al. 2018). And also, anti-*Anaplasma* spp. antibodies were detected as 10.9% (5/46), 7% (3/43), 78.7% (37/47) and 15.2% (7/46) in Van, Muş, Siirt and Diyarbakır provinces, respectively (Oğuz et al. 2018).

Seroprevalence status was evaluated in various studies in neighboring countries and the seroprevalence rates were detected as 9.09% (4/44) in Erbil (Ameen et al. 2012), 13.04% (24/184) in Wassit (Jassem et al. 2015) regions of Iraq and 7.62% (8/105) in Iran (Khezri 2015).

In this study, *Anaplasma* spp. seroprevalence was found to be 38.5% (72/187). The highest seropositivity was determined in Çukurova and Karataş districts. In a study, cattle were found to be 1.18 times more positive in mountainous regions where altitude was 735-482 m above sea level and average temperature was between 26.9°C and 31.8°C. However, the altitude of the regions where the highest positivity was determined in our study was 10-150 m and the temperature was 35-41°C (Noaman et al. 2019). Geographical and climatic differences, reservoir host density and vector tick population that play a role in the spread of infection are the factors that directly affect the prevalence of *Anaplasma* infections. Depending on these reasons, the prevalence of the Anaplasmosis may vary districts to districts or from country to country (Ahmadi-Hamedani et al. 2009; Noaman et al. 2019).

We try to take samples from all districts of Adana with different altitudes and climatic characteristics and animals from different gender, breed and age for supplying reliable epidemiologic data. Seroprevalence was significantly higher in cattle older than 7 years. In a study examining risk factors, with multivariate logistic regression analysis, it was found that *Anaplasma* sp. positivity was 11.32 and 3.11 times higher in elderly (6-10 age) and adults (3-6 age) than in young animals (0-3 age), respectively, similar to this study (Abdela et al. 2018).

The seroprevalence of Anaplasmosis in females was statistically higher than males. In various studies, female hosts appeared to be more prone to tick-borne diseases than males. In this study, immunosuppression in cattle during pregnancy and high lactation may be the cause of high seroprevalence (Atif et al. 2012; RATHERA et al. 2016).

In Turkey, many molecular studies have been carried out to detect *Anaplasma* species. The molecular prevalence of *A. marginale* was detected as 31% in the Thrace region (Aktaş et al. 2017), and 29.1% (57/196) (Zhou et al. 2016), in six provinces



of Turkey. And also, the molecular prevalence of *A. marginale* and *A. centrale* was detected as 2.3% (9/389) and 0.8% (3/389) in Eastern Black Sea region (Aktaş et al. 2011), 6% (9/150) and 5.3% (8/150) in Karaman (Aydın et al. 2019), 7.21% (49/679) and 4.12% (28/679) in Aydın (Hoşgör et al. 2015), respectively.

There were also various molecular studies in countries with borders to Turkey. *Anaplasma marginale* positivity was reported as 44% (88/200) in Iran (Noaman et al. 2019) and 28.12% (18/64) in Al-Nasiriyah city in Iraq (Al-Kasar et al. 2018). Also, in northern Iran, the prevalence of *A. marginale* and *A. centrale* was detected as 9.33% (14/150) and 12% (18/150) (Salehi-Guilandeh et al. 2018), respectively. In this study, the overall molecular prevalence was detected as 4.81% (9/187) and seropositivity (38.5%) was higher than molecular prevalence (4.81%). We think that most of the animals survived after the infection but carrying the antibodies in their blood. It is known that anti-MSP5 antibodies remain approximately 15 to 72 months in cattle (Knowles et al. 1996).

Individual prevalence was detected as 1.6% (3/187) for *A. centrale* and 3.2% (6/187) for *A. marginale* with Nested-PCR. Zhou et al. (2016), studied on 196 cattle and find the overall prevalence as 29.1% from six different provinces (Konya, Karaman, Adana, Urfa, Diyarbakir and Kirklareli) of Turkey and 0% (0/13) in Adana provinces. In this study, there is no epidemiological data such as breed, age, gender and altitude of the sampling areas and also, sample size is so small for Adana region (Zhou et al. 2016).

In conclusion, this is the most comprehensive study for Anaplasmosis in cattle in Adana province. Serologic and molecular prevalence of *Anaplasma* spp., which are important for economic losses, were determined with this study. According to these results, vector control, vaccination and treatment protocols may be recommended in districts with high rates. And also, further studies are needed for determination of other *Anaplasma* and vector species in Çukurova region for clear understanding the epidemiology of Anaplasmosis.

## References

- Abdela N, Ibrahim N, Begna F. (2018). Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma town, Southwestern Ethiopia. *Acta Trop.* 177, 9-18.
- Açııcı M, Bölükbaş CS, Pekmezci GZ, Gürler AT, Umur Ş, Karaer KZ, Çakmak A, Nalbantoğlu AS, Nisbet C. (2016). Seroepidemiological Survey of Bovine Tick-Borne Infections in The Black Sea Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 40,170-174.
- Ahmadi-Hamedani M, Khaki Z, Rahbari S, Kazemi B, Bandehpour M, (2009). Molecular identification of anaplasmosis in goats using a new PCR-RFLP method. *Iran J Vet Res.* 10 (4), 367-372.
- Aktas M, Özübek S. (2017). Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of *Anaplasma marginale* in a dairy cattle. *Comp Immunol Microb.* 54, 20–26.
- Aktaş M, Altay K, Dumanli N. (2011). Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick-borne Dis.* 2, 62–65.
- Al-Kasar NR, Flayyih MM, Al-Jorany AD. (2018). Molecular study of *Anaplasma marginale* parasite in carrier cattle in Al-Nasiriyah city. *Iraqi J Vet Sci.* 32(2), 299-301.
- Ameen KAH, Abdullah BA, Abdul-Razaq RA. (2012). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq. *Iraqi J Vet Sci.* 26, 109-114.
- Atif FA, Khan MS, Iqbal HJ, Roheen T. (2012). Prevalence of Tick-Borne Diseases in Punjab (Pakistan) and Hematological Profile of *Anaplasma marginale* infection in Indigenous and Crossbred Cattle. *Pak J Sci.* 64(1), 11-16.
- Aubry P, Geale DW. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 58(1), 1-30.
- Aydın MF, Özübek S, Aktaş M. (2019). Molecular survey of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Karaman of Turkey, including a novel tandem report of *Anaplasma marginale msp1a* gene. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 66, 255-260.
- Birdane FM, Sevinc F, Derinbay Ö. (2006). *Anaplasma marginale* Infections in Dairy Cattle: Clinical Disease With High Seroprevalence. *Bull Vet Inst Pulawy.* 50, 467-470.
- Gökçe G, Kırmızıgül AH, Yıldırım Y, Erkilic EE. (2013). Kars Yöresindeki Sığırlarda *Anaplasma marginale* Seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 19 (Suppl-A), 187-190.
- Hairgrove T, Schroeder ME, Budke CM, Rodgers S, Chung C, Ueti MW, Bounpheng MA. (2015). Molecular and serological in-herd prevalence of *Anaplasma marginale* infection in Texas cattle. *Prev Vet Med.* 119(1-2), 1-9.
- Hoşgör M, Bilgic HB, Bakırcı S, Unlu AH, Karagenc T, Eren H. (2015). Aydın Yöresinde Sığırlarda ve Kenelerde *Anaplasma / Ehrlichia* Türlerinin Belirlenmesi. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 39, 291-298.
- Isik N, Ekici OD, Sevinc F. (2018). The Endemic Status of *Anaplasma marginale* in Cattle, in Turkey. *Indian J Anim Res.* 52(5), 750-753.

16. Jassem GA, Agaar OA. (2015). Molecular and biochemical study of *Anaplasma marginale* in cattle in Wassit Province of Iraq. *J Bacteriol Res.* 7(4), 36-41.
17. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. (2006). Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia sp.* in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 72(2), 1102-1109.
18. Khezri M. (2015). Seroprevalence of *Anaplasma* Infection in Sheep and Cattle in Kurdistan Province of Iran with an Overview of One Decades of Its Epidemiological Status in Iran. *J Sci Res Rep.* 6(1), 26-36.
19. Knowles D, De Echaide ST, Palmer G, McGuire T, Stiller D, McElwain T. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle. *J Clin Mic.* 34(9):2225-2230.
20. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 167(2-4), 95-107.
21. Kocan KM, de la Fuente J, Cabezas-Cruz A. (2015). The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev Sci Tech.* 34(2), 577-586.
22. Molad T, Mazuz ML, Fleiderovitz L, Fish L, Savitsky I, Krigel Y, Leibovitz B, Molloy J, Jongejan F, Shkap V. (2006). Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet Microbiol.* 113(1-2), 55-62.
23. Noaman V, Moradi M. (2019). Molecular Epidemiology and Risk Factors Assessment of *Anaplasma spp.* on Dairy Cattle in Southwest of Iran. *Acta Vet Eurasia.* 45, 30-36.
24. Oğuz B, Özdal N, Kılınç ÖO, Karakuş A, Çelik BA, Değer MS. (2018). Van, Muş, Siirt Ve Diyarbakır İllerinde Sığırlarda Anaplasmosis'in Seroprevalansı. *Kocatepe Vet J.* 11(3), 208-214.
25. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. (2007). Anaplasmosis. In: *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.* (10 th ed.) Saunders/Elsevier, pp 1455-1459.
26. Rar V, Golovljova I. (2011). *Anaplasma, Ehrlichia*, and "Candidatus *Neoehrlichia*" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol.* 11(8), 1842-61.
27. Rathera SA, Taka H, Kakru DK. (2016). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals of district Ganderbal. *Sci J Vet Adv.* 5(1), 74-79.
28. Salehi-Guilandeh S, Sadeghi-Dehkordi Z, Sadeghi-Nasab A, Yousefi A. (2018). Molecular Detection of *Anaplasma spp.* in Cattle of Talesh County, North of Iran. *Bulg J Vet Med.* DOI: 10.15547/bjvm.2135.
29. Selçuk Ö, Alver O, Çatık S, Aydın L, Şenlik B. (2015). Determination of Diagnostic Value Of cELISA For The Diagnosis Of Anaplasmosis in Clinically Suspected Ruminants. *8Kafkas Univ Vet Fak.* 21 (5), 691-695.
30. Shabana II, Alhadlag NM, Zaraket H. (2018). Diagnostic tools of caprine and ovine anaplasmosis: a direct comparative study. *BMC Vet Res.* 14, 165.
31. Zabel TA, Agosto FB. (2018). Transmission Dynamics of Bovine Anaplasmosis in a Cattle Herd. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* Volume 2018 Article ID 4373981, 1-16.
32. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Moumouni PFA, Jirapattharasate C, Liu M, Wang G, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Xuan X. (2016). Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. *Ticks and Tick-borne Dis.* 7, 126-134.

## A Serological Survey on Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHN) from Rainbow Trout in Turkey

Cüneyt Tamer<sup>1</sup>, Yüksel Durmaz<sup>3</sup>, Hasan Sercan Palancı<sup>1</sup>, Emre Özan<sup>2</sup>, Hamza Kadı<sup>3</sup>, Zafer Yazıcı<sup>1</sup>, Harun Albayrak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs University, Veterinary Faculty, Department of Virology, Samsun, Turkey

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs University, Veterinary Faculty, Department of Veterinary Experimental Animals, Samsun, Turkey

<sup>3</sup>Samsun Veterinary Control Research Institute, Samsun, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 23.08.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 10.10.2019

**Abstract:** Infectious pancreatic necrosis (IPN), viral hemorrhagic septicemia (VHS) and infectious hematopoietic necrosis (IHN) are the most significant viral diseases of salmonid species. This study examined the seroprevalence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) in rainbow trout cultured in Turkey. A total of 597 serum samples of adult trout were obtained from 18 commercial trout farms in the Middle and Eastern Black Sea regions of Turkey and were then examined by the virus neutralization test. As a result of the test, VHSV and IHN antibodies were not detected. However, IPNV antibodies were found in 11 of 18 trout farms (61.1%) and 45 of 597 serum samples (7.5%). Three viral agents characterized as causing persistent infections were serologically screened for the first time in Turkey. The high seropositivity rate against IPNV was namely caused by asymptomatic carrier broodstock fish.

**Key words:** IHN, IPN, Serology, Trout, VHS.

### Türkiye'deki Gökkuşluğu Alabalıklarında Enfeksiyöz Pankreas Nekrozu Virüsü (IPNV), Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) ve Enfeksiyöz Hematopoetik Nekroz Virüsü'nün (IHN) Serolojik Olarak Araştırılması

**Özet:** Enfeksiyöz pankreas nekrozu (IPN), viral hemorajik septisemi (VHS) ve enfeksiyöz hematopoetik nekroz (IHN), salmonid türlerinin en önemli viral hastalıklarıdır. Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen gökkuşluğu alabalıklarında enfeksiyöz pankreas nekrozu virüsü (IPNV), viral hemorajik septisemi virüsü (VHSV) ve enfeksiyöz hematopoetik nekroz virüsü (IHN) seroprevalansı incelenmiştir. Türkiye'nin Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerinde bulunan 18 ticari alabalık çiftliğinden toplam 597 adet alabalığı kan serumu örneği alınmış ve daha sonra virüs nötralizasyon testi ile incelenmiştir. Test sonucunda VHSV ve IHN antikorları tespit edilmedi. Ancak, IPNV antikorları 18 alabalık çiftliğinin 11'inde (%61,1) ve 597 serum numunesinin 45'inde (%7,5) bulundu. Türkiye'de kalıcı enfeksiyonlara neden olan üç viral ajan serolojik olarak tarandı. IPNV'ye karşı yüksek seropozitiflik oranı, yani asemptomatik taşıyıcı yavru balıklardan kaynaklanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Alabalık, IHN, IPN, Seroloji, VHS.

## Introduction

Intensively culturing fish in a high population density increases the incidence of infections and thus facilitates the spreading, settlement and longer duration of diseases. Also, infectious diseases are held responsible for economic losses that affect the development of aquaculture. Infectious pancreatic necrosis (IPN), viral hemorrhagic septicemia (VHS) and infectious hematopoietic necrosis (IHN) are the most significant viral diseases of salmonid species (Crane and Hyatt, 2011). Infections are typically

spread internationally by the transportation of hard roe and fry fish, and by the migration of anadromous fishes (Albayrak and Özan 2010).

In Turkey, the fishery sector has developed rapidly and has led to the emergence of many industrial areas. A total of 537,345 tons of aquatic products have been produced in our country as of 2014 and 43.7% of this production is from aquaculture. 48.3% (113.593 thousand tons) of aquaculture production is trout production (GTHB, 2016). The fishery industry has become a significant industry

in Turkey and continues to grow. Aquaculture production comprised 43.7% of total fishery production in 2014. Also, trout aquaculture comprised 48.3% of aquaculture production (Gürceay et al., 2013). The amount of research on viral infections and their effect on economic loss in the trout farming in Turkey, is quite scarce. Although the presence of IHNV and VHSV was reported (Değirmenci et al. 2008; Gürceay et al. 2013; Işıdan and Bolat 2011; Işıdan and Kutlu 2014; Kalaycı et al. 2006), there is no research which provides evidence of antibodies against these viruses.

IPNV belongs to the *Aquabirnavirus* genus of the *Birnaviridae* family. IPNV has icosahedral symmetry and is an enveloped virus having two segments and double-stranded RNA. IPNV has two segments which are called segment A, which has 2,5 kb RNA, and segment B, which has 2,3 kb RNA (Albayrak and Özcan 2010).

VHS has wide host range. This virus is isolated from different regions of the world and causes economic losses worldwide (Ammayappan et al., 2010, Rexhepi et al., 2009). *Piscine novirhabdovirus* is an enveloped virus which has non-segmented RNA. VHS is caused by *Piscine novirhabdovirus* of the *Novirhabdovirus* genus of the *Rhabdoviridae* family (Einer-Jensen et al. 2014; ICTV. 2016; Işıdan and Kutlu 2014; Kima et al. 2015).

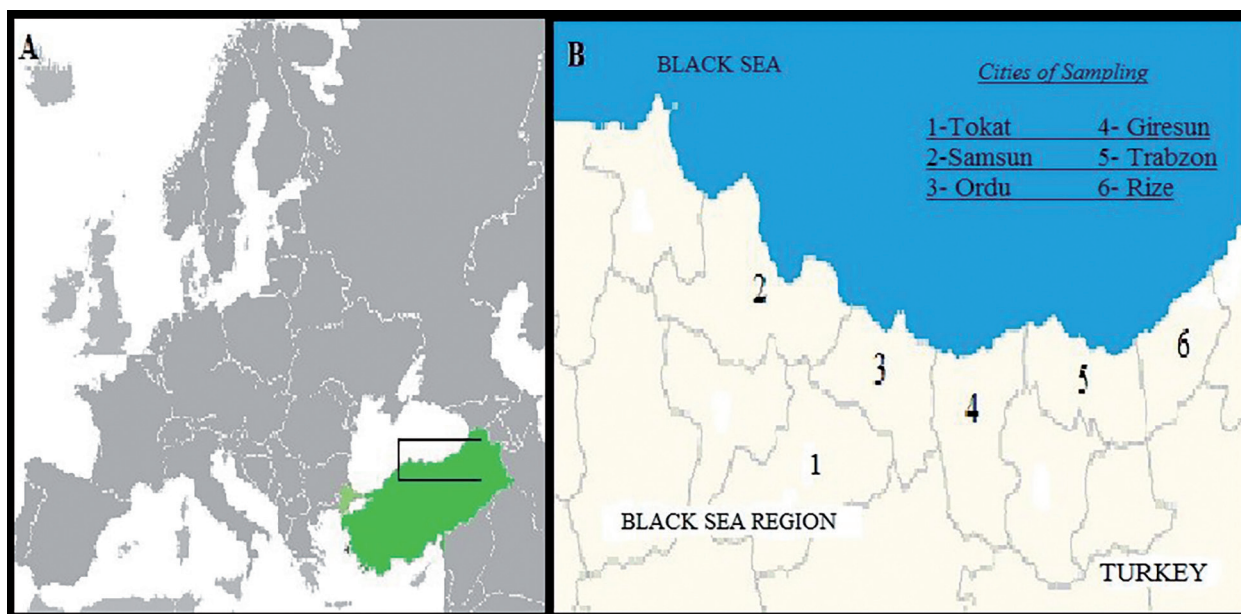
IHN, which is characterized as part of the *Salmonid novirhabdovirus* species of the *Novirhabdovirus* genus of *Rhabdoviridae* family, causes high mortality and acute-systemic infection in fish. The *Salmonid novirhabdovirus* genome contains approximately 11 kb and single-stranded RNA. According to filogenetic analysis results, *Salmonid novirhabdovirus* is divided into five big genogroups: U, M, L, E and J (Ammayappan et al. 2010; ICTV. 2016; Jia et al. 2014, Nishizawa et al. 2006).

These serological assays are important for the detection of asymptomatic transporters because of the persistence of these three viruses (Albayrak and Özcan 2010; Candan 2002).

## Material and Methods

### Serum samples

Fishes collected the serum samples was approximately 200-250 grams rainbow trout from 18 different commercial trout farms in the Middle and Eastern Black Sea regions of Turkey. Serum samples were collected from trout farms in Samsun, Ordu, Tokat, Giresun, Trabzon and Rize provinces between 2011 and 2012. Each sample (597) was inactivated at 42°C for 30 minutes and was stored at -20°C.



**Figure 1.** Areas in the Middle and Eastern Black Sea where rainbow trout were collected for viral examination



### Cell Lines and Virus Isolates

IPN 1054 (sp serotype), VHS Bolu (Ie genotype) and IHN-ref virus (Albayrak and Özcan 2010; Albayrak et al. 2018), which were received from the Samsun Veterinary Control Institute, were used as assays. The RTG-2 cell line was used to produce the viruses and as the neutralization assay. A Leibovitz's L-15 medium which contained 1% penisilin (10,000 U/ml) - streptomycin (10 mg/ml) - amphotericin B (0.025 mg/ml), 1,5 mM hepes and 10% fetal calf serum was used to produce the cell line and viruses.

### Virus Titration Assay

Titration was conducted by the microtitration method in 96 well-plates. The serum was diluted from  $10^{-1}$  to  $10^{-12}$  and four wells were used for each dilution, having a total volume of 100  $\mu$ l. 50  $\mu$ l of cell suspension which contained 300,000 cells in one milliliter was added into each well and the plates were incubated at 15°C. The cytopathic effect was checked daily. After 7 days of incubation at 15°C, the TCID<sub>50</sub> value was calculated according to Reed and Muench (1938). This method was conducted three times for each virus (Darling et al., 1998).

### Virus Neutralization Assay

Trout serums were diluted at 1/10 and samples were put in two wells for each serum at 50  $\mu$ l. 50  $\mu$ l virus solutions of 100 TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> were added into the wells. After that 50  $\mu$ l the cell solution containing 300,000 cells in one milliliter was added into each well and plates were incubated at 15°C for 7 days. This method was done three times for each virus (Albayrak and Özcan 2010).

### Serum Neutralization Assay

Positive samples obtained according to the virus neutralization assay results were diluted as log<sub>2</sub> in 96 well plates. Virus solutions of 100 TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> were added into the wells. Cell solutions containing 300,000 cells in one milliliter, were added into solutions and were incubated at the 15°C incubator. ND<sub>50</sub> rate was calculated after seven days of incubation (Reed and Muench 1938).

### Results

For IPNV, 45 samples (7.5%) of 597 samples were detected as having antibodies against IPNV (Table

1). All of the 597 samples were detected as having no antibodies against VHSV and IHNV. Antibodies against IPNV were detected in 11 (61.1%) of 18 enterprises in 6 cities. Evaluation results and ND<sub>50</sub> values are shown in Table 2.

**Table 1.** Seropositivity distribution of IPNV virus according to provinces

Provinces	Total positives in enterprises	Total Samples	Positives Samples	Prevalence (%)
Samsun	2 / 2	97	16	16.4
Ordu	4 / 2	110	2	1.8
Tokat	3 / 2	112	2	1.7
Giresun	3 / 2	102	14	13.7
Trabzon	3 / 2	90	9	10
Rize	3 / 1	86	2	2.3
Total	18 / 11	597	45	7.5

**Table 2.** ND<sub>50</sub> assessment results according to the provinces of serums

Provinces	Dilutions Rate of Serums between 1/2 to 1/256						
	1/2-1/4	1/4-1/8	1/8-1/16	1/16-1/32	1/32-1/64	1/64-1/128	1/128-1/256 and above
Samsun				1		1	13
Ordu							2
Tokat							2
Giresun			1			2	9
Trabzon					3		6
Rize							2
Total			1	1	3	3	34

### Discussion

VHS is the most important viral disease among trouts in Europe. VHSV was also reported in various sea fish in North America and Europe (Hedrick et al. 2003). In Turkey, the first report and isolation of VHSV was made from 20-25 day-old turbot at the Black Sea Aquaculture Research Center in 2004, and the calculated mortality rate was 99%. VHSV was firstly isolated in trout in 2006 at Mudurnu, Bolu with a 90% mortality rate (Kalaycı et al. 2012). Although VHSV was reported as en-

demic in the Black Sea region (Nishizawa et al. 2006b), VHSV was not detected in other research conducted between 2007 and 2009 (Işidan and Bolat 2011). However, antibodies against VHSV in aquaculture facilities in the same region were not detected in this study. Consequently, VHSV, which was reported as endemic in turbot fish in the Black Sea region, was not detected in rainbow trout in the same region.

Although presence of IHNV was reported in various regions of the world including North America, Europe, Australia and East Asia, IHNV has not been reported in Turkey (Albayrak and Özan 2010). In this study, antibodies against IHNV were not detected as previously reported (Albayrak and Özan 2010).

In Turkey, IPNV was first reported in 2002 in trout (Candan 2002). IPNV was transmitted via water to other trout enterprises which contained the same water source. It was transmitted through eggs and fry to other trout enterprises which used different water sources (Akhlaghi and Hosseini 2007; Albayrak and Özan 2010; Gurcay et al. 2013).

In another study, IPNV and IHNV were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) in 32 rainbow trout enterprises in the Middle and Eastern Black Sea regions. IHNV was not detected but IPNV was detected at 10 rainbow trout farms and the prevalence of IPNV infection was determined as 44% (Albayrak and Özan 2010). IPNV was isolated from 26 (10.69%) of 243 isolation materials in various regions including the Central Anatolian, Eastern, Southeast and Mediterranean regions of Turkey. In this study, IPNV contamination was detected in each city that was sampled. Seropositivity against IPNV was detected in 11 enterprises (61.1%) of 18 enterprises. In addition, IPNV was detected in 15 samples (7.5%) of 597 serum samples. The findings obtained in this study are the same as other research in Turkey.

The prevalence of IPNV was 11% in another study and 70% of the sampled trout facilities was contaminated with IPNV in Kosovo (Rexhepi et al. 2009). In this study, the prevalence of IPNV was found to be 16.4% in Samsun, 13.7% in Giresun, 10% in Trabzon, 2.3% in Rize, 1.8% in Ordu and 1.7% in Tokat provinces. As a result of serum neu-

tralization tests, antibody titers were calculated 1/8 - 1/16 in 1 enterprise, 1/16 - 1/32 in 1 enterprise, 1/32 - 1/64, 1/64 - 1/128, 1/128 - 1/256 in 3 enterprises, antibody titers of 1/256 and above were detected at 34 enterprises. Thus, IPNV is endemic in the Black Sea Region and should not be ignored.

Consequently, commercial trout farms in Turkey are highly infected with IPNV, although they are not infected with VHSV and IHNV. Therefore, economic losses are likely to occur, especially in trout breeding. It is important to identify infected broodstocks, which are the main source of control, in the spread of the disease and remove them from enterprises. Controlled production with healthy broodstocks will prevent the loss of juvenile fish, making it possible for farmers to eradicate IPNV contamination.

## References

1. Akhlaghi M, Hosseini A. (2007). First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. *Bull Euro Ass Fish Pathol.* 27(5), 205.
2. Albayrak H, Özan E. (2010). Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozis ve enfeksiyöz hematopoietik nekrozis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 57, 125-129.
3. Albayrak H, İsidan H, Kalaycı G, Özan E, Vakharia VN. (2018). Genetic analysis of the complete G gene of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotype 1e isolates from Turkey. *Iran J Fish Sci.* 17(1), 67-73.
4. Ammayappan A, LaPatra ES, Vakharia NV. (2010). A vaccinia-virus-free reverse genetics system for infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods.* 167, 132-139.
5. Ammayappan A, Kurath G, Thompson MT, Vakharia NV. (2011). A reverse genetics system for the Great Lakes strain of viral hemorrhagic septicemia virus: the NV gene is required for pathogenicity. *J Mar Biotechnol.* 13, 672-683.
6. Candan A. (2002). First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bull Euro Ass Fish Pathol.* 22(1), 45-48.
7. Crane M, Hyatt A. (2011). Viruses of Fish: An overview of significant pathogens. *Viruses.* 3, 2025-2046.
8. Darling JA, Boose AJ, Spaltro J. (1998). Virus assay methods: Accuracy and validation. *Biologicals,* 26, 105-110.
9. Değirmenci U, Nemli E, Çağırğan H. (2008). Türkiye'nin değişik bölgelerinden enfeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü izolasyonu. I. Ulusal Alabalık Sempozyumu. Turkey. Isparta. November.

10. Einer-Jensen K, Harmache A, Biacchesi S, Bremont M, Stegmann A, Lorenzen N. (2014). High virulence differences among phylogenetically distinct isolates of the fish rhabdovirus viral hemorrhagic septicaemia virus are not explained by variability of the surface glycoprotein G or the nonvirion protein Nv. *J Gen Virol.* 95, 307-316.
11. Gurcay M, Turan T, Parmaksız A. (2013). Türkiye’de kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*, 1792) infeksiyöz pankreatik nekrozis virus varlığının tespiti üzerine bir araştırma, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 141-146.
12. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB). 2016. Su ürünleri istatistikleri 2016 yılı raporu, 1-12.
13. Hedrick RP, Batts WN, Yun S, Traxler GS, Kaufman J, Winton JR. (2003). Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis Aquat Organ.* 55. 211–220.
14. ICTV. (2016). ICTV Master Species List 2016. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776>.
15. Işidan H, Bolat Y. (2011). A survey of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Turkey. *Turk J Fish Aquat Sc.* 11, 507-513.
16. Işidan H, Kutlu I. (2014). Viral hemorajik sepsisemi virüs genotip 1e suşlarının çipura (*Sparus Aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus Labrax*) balıkları üzerinde patojenitelerinin belirlenmesi. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2, 49-53.
17. Jia P, Zheng CX, Shi JX, Shi-Fu KD, Jin-Jin WB, Jun-Qiang HE, Ning-Yi J. (2014). Determination of the complete genome sequence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) Ch20101008 and viral molecular evolution in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 418–431.
18. Kalaycı G, Incoglu S, Ozkan B. (2006). First isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virüs from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bull Euro Ass Fish Pathol.* 26, 157-161.
19. Kalaycı G, İnçoğlu Ş, Özyer ÖB, Kucukali Y. (2012). Türkiye’de infeksiyöz pankreatik nekrozis ve viral hemorajik sepsisemi hastalıklarının durumu. *J of Bornova Vet Cont Res Inst.* 34(48), 31-38.
20. Kima HS, Yusuff S, Vakharia NV, Evensen O. (2015). Interchange of L polymerase protein between two strains of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotype IV alters temperature sensitivities in vitro. *Virus Research.* 195, 203–206.
21. Nishizawa T, Kinoshita S, Kim WS, Higashi S, Yoshimizu M. (2006). Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis Aquat Organ.* 71, 267–272.
22. Nishizawa T, Savaş H, Işidan H, Üstündağ C, Iwamoto H, Yoshimizu M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol.* 72, 2373-2378.
23. Reed LS, Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *J Tro Med.* 27, 493-497
24. Rexhepi A, Scheinert P, Bërzhholli K, Hamidi A, Sherifi K. (2009). Occurrence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Kosovo. *Veterinaria.* 58(1-2), 47-53.

# Aşılı Köpeklerin İdrarlarında *Leptospira* spp. Varlığının PCR Yöntemi ile Araştırılması\*

Özgür Akgül<sup>1</sup>, Özer Akgül<sup>2</sup>, Naciye Yakut Özgür<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyoloji AD, İstanbul*

<sup>2</sup>*İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

Geliş Tarihi / Received: 26.08.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 29.11.2019

**Özet:** Leptospiroz; Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik bir bakteri olan *Leptospira* spp.'nin neden olduğu çoklu organ tutulumları ile seyreden zoonoz bir enfeksiyon hastalığıdır. Leptospiroz teşhisi için; klinik/otopsi bulguları, mikroskopik kültür, hayvan deneyleri, seroloji ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada, İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerine getirilen leptospiroza karşı aşılanmış köpeklerin idrar örneklerinde *Leptospira* spp. varlığının hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğu bildirilen real-time PCR tekniği ile saptanması ve *Leptospira* spp. pozitifliği ile idrar yoluna ait semptomlar, yaş ve cinsiyet gibi değişkenlerin istatistiksel ilişkisinin karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, idrar yolu semptomu olan ve olmayan toplam 100 aşılı köpekten (56 dişi, 44 erkek) alınan idrar örnekleri randomize olarak dahil edilmiştir. *Leptospira* spp. varlığının belirlenmesi amacı ile alınan idrar örneklerinde DNA ekstraksiyonu ve real-time PCR yöntemi uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 100 köpeğe ait idrar örneklerinin 7 (%7) tanesi *Leptospira* spp. varlığı açısından pozitif bulunmuştur. Saptanan pozitifliklerin gruplara göre düzensiz dağılımı ve olgu sayısının istatistiksel anlamlılığa etki edecek düzeyde yeterli olmayabileceği gibi nedenlerden dolayı; yaş, cinsiyet farklılığı gibi demografik veriler ve semptomu olan veya olmayan köpeklerin PCR pozitiflikleri istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunamamıştır. Leptospirozun günümüzdeki öneminin daha açık bir şekilde anlaşılabilmesi, teşhisinde kullanılacak en uygun yönteminin belirlenebilmesi, aşılanmanın önleyici etkilerinin değerlendirilebilmesi gibi amaçlar ile; daha çok olgu sayısını içeren, prospektif ve tedavi seçeneklerinin de değerlendirildiği geniş araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Aşı, *Leptospira* spp., PCR

## Investigation of the Presence of *Leptospira* spp. PCR in Urine Sample of Vaccinated Dogs

**Abstract:** Leptospirosis is a zoonotic infectious disease with multiple organ involvement caused by *Leptospira* spp., a Gram-negative, non-spore-free, non-capsular and aerobic bacterium. For the diagnosis of leptospirosis; clinical/autopsy findings, microscopy, culture, animal experiments, serology and PCR (Polymerase Chain Reaction) methods are used. In this study, the presence of *Leptospira* spp. in urine samples of dogs vaccinated against Leptospirosis brought to private veterinary clinics in İstanbul province was determined by a real-time PCR technique which was reported to be a fast and sensitive method, and a comparative evaluation of *Leptospira* spp. positivity with urinary tract symptoms, age and gender were compared. Urine samples from 100 vaccinated dogs (56 females, 44 males) with and without urinary tract symptoms were randomly included in the study. In order to determine the presence of *Leptospira* spp., DNA extraction and real-time PCR were performed in urine samples. Of the 100 dogs included in the study, 7 (7%) were positive for the presence of *Leptospira* spp.. Due to the irregular distribution of the positives determined by the groups and the number of cases may not be sufficient to affect the statistical significance; demographic data such as age, sex differences and PCR positivity of dogs with or without symptoms were not found statistically significant. To understand the current importance of leptospirosis more clearly, to determine the most suitable method for diagnosis, to evaluate the preventive effects of vaccination; more studies including prospective and treatment options are needed.

**Key words:** *Leptospira* spp., PCR, Vaccine

## Giriş

Leptospiroz Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik spiroket şekilli bir bakteri olan *Leptospira* türlerinin neden olduğu bir hastalıktır. Dünyada

yaygın olarak görülen leptospiroz, köpeklerde grip benzeri lezyonlarla karakterize anikterik formdan ikterik forma (Weil Hastalığı) kadar geniş kliniğe sahip bakteriyel kökenli bir zoonotik enfeksiyon

\* **Etik Kurul Onayı:** İlgili araştırma, T. C. İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.07.2010 tarih ve 121 numaralı karar ile incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 13965 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

**Yazışma adresi / Correspondence:** Özgür Akgül (ORCID: 0000-0002-2019-5621), Forvet Veteriner Kliniği Yalı Mah. Şehit Nedim Özpölat Sok. Maltepe Stadı No:2/B Maltepe, İstanbul E-posta: akgulozer@hotmail.com



hastalığıdır (Ellis 2015). Köpeklerde bu hastalığa sıklıkla *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira pomona*, *Leptospira bratislava* ve *Leptospira hardjo* türleri neden olmaktadır (Schuller ve ark. 2015). *Leptospira* türlerinin bulaşı genellikle kontamine meralar, içme suları, atık fütuslar, uterus akıntıları ve en önemlisi de infekte idrarla temas yolu ile gerçekleşmektedir. Enfeksiyon başta tropikal ve subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkeler olmak üzere, canlıların yaşadığı tüm bölgelerde görülebilmektedir (Pinto ve ark. 2017). Leptospiroz için olası risk grupları arasında tarım işçileri, maden işçileri, lağım/kanal temizleyenler, kasaplar, hayvan yetiştiricileri, veteriner hekimler, avcılar, çöp toplayıcılar ve endemik bölgelerde bulunan askerler yer almaktadır. Bu nedenle, leptospiroz uzun süre çiftçiler, veteriner hekimler, kanalizasyon işçileri için mesleki bir hastalık olarak düşünülmüştür (Bergman ve ark. 2017b).

Bildirimi zorunlu olmayan ve tanısındaki zorluklar nedeniyle, leptospiroz için global olarak bildirilmiş güvenilir bir epidemiyolojik veri bulunmamaktadır. Ancak, Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) bağlı Leptospirosis Burden Epidemiology Grubu dünya genelinde yıllık 48.600 ölüme neden olan toplamda 873.000 leptospiroz vakası olduğunu tahmin etmektedir (WHO 2019). Genellikle böbrek proksimal tübülüsüne kolonize olan ve klinik belirti göstermeyen *Leptospira* türleri rezervuar konaklar tarafından idrarla birkaç gün veya yaşam boyunca atılabilmektedir. Böylece bakteri indirekt olarak çevresel nem, nötral toprak ve ılık iklim koşulları gibi faktörlere bağlı olarak bulaşabilmektedir (Knöpfler ve ark. 2017). Leptospiroz tanısının hızlı bir şekilde konması uygun tedavi ve infekte köpeklerin zoonotik açıdan risk oluşturması nedeniyle önem kazanmaktadır. Günümüzde Mikroskobik Aglutinasyon Testi (MAT) kısıtlılıklarına rağmen (erken enfeksiyonda negatif, aşıya bağlı antikolar nedeniyle pozitif sonuç alınması) köpeklerdeki leptospiroz için hala önerilen doğrulama testi olarak kabul edilmektedir. Bazı merkezlerde Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi, IgG ve IgM antikoları arasında sahip olduğu ayırım yeteneği ile mevcut enfeksiyon ve aşılama durumlarını ayırt edebilen bir test olarak tercih edilmektedir. *Leptospira* spp. DNA'sını saptama temelli ve duyarlılık/özgüllük oranları diğer tanı yöntem-

lerine kıyasla daha yüksek olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler ise son yıllarda kabul görmekte ve bu yöntemlerin sağladıkları avantajlar nedeniyle leptospiroz tanısında kullanımları artış göstermektedir (Bergman ve ark. 2017a).

Antibiyotik tedavisi olarak doksisisiklin ve penisilin seçenekleri başta gelmekte ve tedavinin ilk 3-4 gün içinde başlanması durumunda daha etkili olduğu kabul edilmektedir. Leptospiroz kontrolündeki en temel nokta, *Leptospira* spp. için kaynak konumundaki hayvanlardan ve/veya onların idrarları ile kontamine olan bölgelerden uzak durmaktır. Bunun yanı sıra kemirgen kontrolü, taşıyıcıların tedavisi, mesleki hijyen ve sağlıklı hayvanların rutin olarak aşılması da önerilen diğer kontrol yöntemleri arasında yer almaktadır (Murphy 2018).

Bu çalışmada, İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerine getirilen leptospiroza karşı aşılansız köpeklerin idrar örneklerinde *Leptospira* spp. varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, köpeklere rutin olarak uygulanan aşının (Vanguard plus 5L4) *Leptospira* spp. yayılımını engelleme başarısının değerlendirilebilmesi ve aşı içeriğinde bulunmayan serovarların idrarla yayılma olasılıklarının anlaşılabilmesi nedeniyle aşılansız köpekler dahil edilmiştir. Ayrıca, düşük deteksiyon limiti ( $\geq 10$  hücre), yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip olması (Smythe ve ark. 2002), hızlı sonuç alınabilmesi ve aşılama kaynaklı yalancı pozitifliklerin oluşmayacağı gösterilmiş olması (Midence ve ark. 2012) nedenleri ile aşılı köpeklerdeki *Leptospira* spp. DNA'sı Real-time PCR tekniği ile moleküler düzeyde araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler

Çalışma İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (İstanbul Üniversitesi -HADYEK2010-121). Çalışma için gerekli etik kurul onayı alındıktan sonra, araştırmaya İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerine gelen ve Leptospiroza karşı aşılansız toplamda 100 köpek (56 dişi; 44 erkek) dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpeklere ait yaş, cinsiyet ve ırk gibi sosyodemografik veriler ile köpeklerdeki sistemik muayene ve/veya anamnezde saptanan idrar yolu hastalıkları semptomları (disüri, hematüri, oligoüri

veya poliüri) kaydedilmiştir. Spontan ürinyasyon ile aseptik koşullar altında steril kaplarda toplanan idrar örnekleri santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan sediment DNA ekstraksiyonu yapılanaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### DNA Ekstraksiyonu

Elde edilen sediment örnekleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ile 260 nm ve 280 nm'deki Optik Dansite (OD)'leri, NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile ölçülmüştür. Firmanın önerileri doğrultusunda, uygun konsantrasyon aralığı (ng/ $\mu\text{L}$  cinsinden) ve uygun saflıkta (A 260/280 oranına göre) bulunan ekstraktlar PCR yapılacağı zamana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### DNA Amplifikasyonu

DNA miktar uygunlukları belirlenen ekstraktlar Real-time PCR yöntemiyle LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda amplifiye edilmiş

ve *Leptospira* spp. varlıkları  $C_T$  (Cycle Threshold) değerlerine göre kantitatif olarak tespit edilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan primer ve probalar, önceki yayınlarda (Smythe ve ark. 2002, Appelt ve ark. 2014) tariflendiği şekli ile GenBank nükleotid sekans veritabanından *Leptospira* spp. 16S rDNA kısmi sekans verileri sıralı olarak dizilerek hazırlanmıştır. Primerlerin hazırlanması Primer Express™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, ABD) programı ile hazırlanan primerler ve probun Leptospiral dizileri belirleme yetenekleri ise Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı (Altschul ve ark. 1990) ile değerlendirilmiştir. Leptospiral DNA amplifikasyonunda, 45  $\mu\text{L}$  TaqMan PCR Mastermix (parti no:4304437, Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) karışımına 5  $\mu\text{L}$  DNA eklenerek son konsantrasyonun herbir primer için 3 pmol/ $\mu\text{L}$  ve probe için 2 pmol/ $\mu\text{L}$  olması sağlanmıştır. Ayrıca, olası DNA kontaminasyonlarının belirlenmesi için karışımı içeren şablonuz kontrol (NTC) eklenmiştir. Amplifikasyon döngüsü ise, her biri  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 15 saniye ve  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 1 dakikalık sürelerden oluşan toplamda 40 döngülük bir program ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan primer ve probe dizilimleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** *Leptospira* spp. saptanması için kullanılan primer ve probe sekansları

<b>Forward primer</b>	<b>5 → 3</b>	CCC GCGTCCGATTAG
<b>Reverse primer</b>	<b>5 → 3</b>	TCCATTGTGGCCGRA/GACAC
<b>Probe</b>	<b>5 → 3</b>	FAM-CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC-TAMRA

### İstatistiksel Analizler

Çalışmaya dahil edilen köpeklerin sosyodemografik ve semptomatolojik verileri ile *Leptospira* spp. PCR pozitiflik ve negatiflik durumları arasındaki ilişki Statistical Package for the Social Science (SPSS) versiyon 17.0 paket programı (IBM, SPSS Inc, Chicago, IL) kullanılarak değerlendirilmiştir. Normallik denetimi Shapiro Wilk testi, Histogram, Q-Q plot ve box plot grafikleri ile kontrol edilmiştir. Grup varyanslarının homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenler ki-kare, Yates düzeltmeli ki-kare ve Fisher'in kesin olasılık testleriyle değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları ortalama, standart sapma, ortanca değer, en küçük değer, en büyük değer, frekans ve/veya yüzde şeklinde verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  ve çift yönlü olarak ele alınmıştır.

### Bulgular

İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerindeki *Leptospira* spp.'ye karşı aşılı 56 (%56)'sı dişi; 44 (%44)'ü erkek cinsiyetten toplamda 100 köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplamda 100 köpeğin en küçüğünün 6 aylık en büyüğünün ise 12 yaşında olduğu ve köpeklerin ortalama yaşlarının  $4,36 \pm 2,45$  yıl olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen dişi köpeklerin yaş ortalamalarının  $4,46 \pm 2,41$  yıl; erkek köpeklerin ise  $4,23 \pm 2,5$  ortalama yaş değerinde olduğu hesaplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen köpekler idrar yollarına ait bir semptom (disüri, hematüri, oligoüri veya poliüri) varlığı açısından incelendiğinde toplamda 39 (%39) köpekte idrar yollarına ait bir semptom olduğu; dişi köpeklerin 20'sinin (%35,7), erkek köpeklerin ise 19'unun (%43,2) idrar yollarına ait bir

semptomu sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya ait semptom varlığını gösteren veriler Tablo 2’de alınan köpekler için yaş, cinsiyet ve idrar yollarına sunulmuştur.

**Tablo 2.** Çalışmaya dahil edilen köpeklerin sosyodemografik ve semptomatolojik verileri

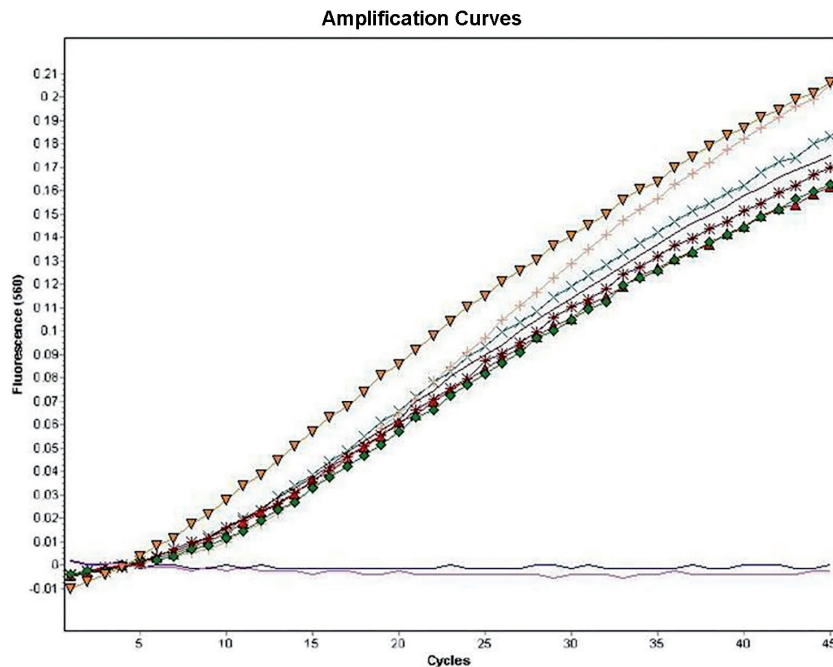
		Yaş (yıl)	İdrar yolu semptom varlığı
		Ortalama±Standart sapma (min – max)	n (%)
Cinsiyet	Dişi	4,46 ± 2,41 (1 – 11)	20 (%35,7)
	Erkek	4,23 ± 2,5 (1/2 – 12)	19 (%43,2)
Toplam		4,36 ± 2,45 (1/2 – 12)	39 (%39)

Çalışmaya dahil edilen toplamda 100 köpeğin 7 (%7)’sinde real-time PCR yöntemi ile *Leptospira* spp. saptanmıştır. Pozitiflik saptanan 7 örneğin 7,98 ile 34,91 arasında değişen  $C_T$  değerlerinin ortalaması  $13,26 \pm 8,94$  olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpeklerin yaş, cinsiyet ve idrar yolu

semptomlarına ait verilerin bu örneklere uygulanan *Leptospira* spp. PCR test sonucu ile istatistiksel olarak karşılaştırılması Tablo 3’te sunulmuştur. PCR yöntemi ile pozitif olarak belirlenen örneklerin *Leptospira* spp. DNA’larına ait amplifikasyon eğrileri Şekil 1’de sunulmuştur.

**Tablo 3.** *Leptospira* spp. PCR sonuçları ile sosyodemografik ve semptomatolojik verilere ait karşılaştırmalı istatistiksel sonuçlar

Değişken n (%)		<i>Leptospira</i> spp. PCR negatif	<i>Leptospira</i> spp. PCR pozitif	p değeri
Cinsiyet	Dişi	53 (%94,6)	3 (%5,4)	0,468
	Erkek	40 (%90,9)	4 (%9,1)	
Yaş	<1 yıl	9 (%100)	0 (%0)	0,528
	1 – 7 yıl	73 (%93,2)	5 (%6,8)	
	>7 yıl	11 (%88,2)	2 (%11,8)	
İdrar yolu semptomu	Yok	56 (%91,8)	5 (%8,2)	0,557
	Var	37 (%94,9)	2 (%5,1)	



**Şekil 1.** *Leptospira* spp. DNA pozitif örneklerin PCR amplifikasyon eğrileri

## Tartışma ve Sonuç

Köpeklerde görülen leptospiroz büyük önem taşımakta ancak hastalık genellikle asemptomatik seyrettiğinden, hastalığın teşhisinde zorluklar yaşanmaktadır. Dünyada ve ülkemizde halen yaygın bir hastalık olmaya devam eden bu patojenin teşhisinin zamanında yapılabilmesi ve baskın serovarların saptanarak daha etkin tedavi ve koruma politikalarının geliştirilmesini amaçlayan çalışmalar bulunmaktadır (Fraune ve ark. 2013, Rojas ve ark. 2010). *Leptospira* türlerinin PCR ile belirlenmesinde köpeklerden elde edilen kan örnekleri, idrar örnekleri, semen örnekleri, formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku örnekleri kullanılmıştır (Fraune ve ark. 2013, Bal ve ark. 1994, Kim ve ark. 2006, Murphy 2018). Günümüzde, diğer tüm patojenlerde olduğu gibi *Leptospira* spp. tanısında ölü bakterileri de tespit edebilmesi, daha yüksek duyarlılık/özellik oranlarına sahip olması ve kolay uygulanabilmesi gibi avantajlar nedeniyle PCR yöntemine bir eğilim bulunmaktadır (Saad ve ark. 1997).

İnsanlarda *Leptospira* spp. antikorlarının araştırıldığı çalışmalarda çeşitli ülkelerde farklı prevalanslar saptanmıştır. Örneğin Hindistan'da %21,3, İtalya'da %6,36, Tayland'da %11'lik *Leptospira* spp. pozitifliği bildirilmiştir (Venkataraman ve ark. 1992, Cerri ve ark. 2003, Meeyam ve ark. 2006). Leptospiroz prevalansındaki bu majör farklılığın olası nedeni olarak, bakterinin dış ortamda canlı kalabilmesi için en uygun iklimin tropikal iklim olması ve bu koşullarda da en yüksek prevalansın yağışlı mevsimde görülmesi gösterilmiştir (Ward ve ark. 2002). Köpeklerde PCR ile *Leptospira* spp. varlığının incelendiği çalışmalarda Amerika'da %8,8 ve İran'da %22 oranında pozitiflik saptanmıştır (Harkin ve ark. 2003, Zakeri ve ark. 2010). Bizim araştırmamız ile benzer olarak Rojas ve ark. (2010) tarafından 525 köpeğin idrar örneklerini *Leptospira* spp. varlığı açısından PCR ile incelendiği bir çalışmada 37 köpekte (%7,05) pozitiflik saptanmıştır. Ülkemizde leptospiroz ile ilgili araştırmalar genellikle hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalar veya insan olgu sunumları niteliğindedir. Çeşitli ülkelerde yapılan bu çalışmalar, leptospirozun halen global olarak köpek popülasyonunda yaygın olarak bulunduğunu ve zoonoz potansiyelini vurgulamaktadır.

Köpeklerde *Leptospira* spp. seropozitifliğinin yaşa bağlı olarak dağılımının köpeklerdeki cinsel olgunluğa erişme dönemi ile ilişkili olarak değiştiği düşünülmektedir. Ülkemizde bu konuda yapılan bir çalışmada, bir yaşından küçük köpeklerde *Leptospira* spp. seropozitifliği %24, bir yaşından büyük köpeklerde ise %27,5 olarak belirlenmiştir (Ülgen ve ark. 1997). Global olarak ise bir yaşından büyük köpeklerde seropozitiflik oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Arimitsu ve ark. 1989, Venkataraman ve ark. 1992). *Leptospira* spp. seropozitifliği ve yaş arasında saptanan farklı sonuçların, yapılan çalışmalarda genel olarak kabul gören birinci yaş döneminin genellikle cinsel olgunluk kriteri olarak kabul edilmesine karşın, sokak köpeklerinin bir yaşından birkaç ay önce çiftleşebilecekleri ve hayvanların bir yaş öncesi ve sonrası ayrımının yapılmasının zor olabileceği nedenleri ile ilişkili olabileceği unutulmamalıdır. Bu çalışmada, leptospiroz pozitifliği 1 yaş altı köpeklerde hiç saptanmazken, 1-7 yaş aralığında %6,8 ve 7 yaşından büyük köpeklerde %11,8 oranında *Leptospira* spp. DNA'sı PCR yöntemi ile saptanmıştır. Ancak, köpeklerin yaşları ile pozitiflik oranları arasında olgu sayısının azlığı gibi olası nedenler ile istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,528$ ).

Köpeklerde *Leptospira* spp. seropozitifliğinin cinsiyete bağlı dağılımlarının incelendiği çalışmalarda genel olarak erkek cinsiyetteki köpeklerde daha yüksek pozitiflik oranları belirlenmiştir. Ülkemizde konu ile ilgili yapılan araştırmalarda erkek köpeklerde %30,2 ve %6,5 oranlarında, dişi köpeklerde ise %19,5 ve %13,7 oranlarında seropozitiflik saptanmıştır (Özdemir 1998, Ülgen ve ark. 1997). Global literatür verileri incelendiğinde, dünyada yapılan çalışmalarda erkek ve dişilerdeki seropozitiflik oranı sırasıyla %47 - %38 (Everard ve ark. 1987), %27,6 - %18,9 (Arimitsu ve ark. 1989), %68,3 - %31,7 (Hartman 1984) olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda erkeklerdeki seropozitiflik oranının dişi köpeklere göre daha yüksek olarak belirlenmesinin araştırmacılar tarafından, erkek köpeklerin genital bölgeyi koklama ve yeni yapılan idrarı yalama eğilimleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Hartman 1984). Literatür verileri ile uyumlu olarak bu çalışmada *Leptospira* spp. PCR pozitifliği erkek köpeklerde (%9,1) dişi köpeklere (%5,4) kıyasla daha yüksek olarak belirlenmiştir ( $p=0,468$ ).



*Leptospira* spp. seropozitifliğinin semptom gösteren veya herhangi bir semptom göstermeyen köpeklerde karşılaştırıldığı çalışmaların az bulunması nedeniyle, yapılan literatür araştırmasında konu ile ilgili anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Semptomatik olan köpeklerin, asemptomatik köpekler ile *Leptospira* spp. varlığı açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada; retrospektif olarak 159 leptospiroz ön tanı köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Bunların 20 tanesinde *Leptospira* spp. pozitifliğinin belirlenmiş pozitif kabul edilenlerin 16 tanesi semptomatik; 4 tanesi ise asemptomatik olarak değerlendirilmiştir (Mastrorilli ve ark. 2007). Prospektif temelde dizayn edilen bu çalışmada ise, PCR ile *Leptospira* spp. taşıyıcısı olduğu belirlenen köpeklerden ikisi (%5,1) semptomatik (hematüri, disüri), 5'i (%8,2) ise asemptomatik olarak değerlendirilmiştir ( $p=0,557$ ).

İmmünolojinin en büyük keşiflerinden olan ve yıllardır güvenilir olarak uygulanan aşılama programlarının patojen yayılımını engellemedeki başarısı kabul gören bir gerçektir. Ancak, ticari olarak piyasada bulunan leptospiroz aşıları; sığır, domuz ve köpekler için genel olarak kullanılabilir durumda olmakla birlikte bu aşılarda, bağışıklığı kısmi oranlarda artırabilmesi ve içeriklerinde yalnızca potansiyel olarak etkin serovarların bulunması nedenleri ile kısmen etkili oldukları saptanmıştır. Köpek aşıları genellikle, serovar *canicola* ve *icterohaemorrhagiae* içermektedir. Aşılar genellikle hastalığa ve deneysel koşullarda renal saçılıma karşı koruma özelliği gösterse de, aşılanmış köpeklerden insanlara serovar *icterohaemorrhagiae* bulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca, aşılanmış köpekler ticari aşılarda içerisinde bulunan serovarlar dışındaki bir serovar ile de enfekte olabilmektedir (Prescot 2008). Bu nedenle, son yıllardaki aşılarda geleneksel aşı suşlarına ek olarak serovar *grippotyphosa* ve *pomona* serovarlarını da içermektedir (Adler ve Moctezuma 2010). Çalışmaya dahil edilen köpekler *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* ve *Leptospira pomona* suşlarını içeren Pfizer® firmasının "Vanguard plus 5L4" markalı aşısıyla son bir sene içerisinde aşılanmıştır.

Yapılan bu çalışmada aşı köpeklerde PCR yöntemi ile %7 oranında *Leptospira* spp. pozitifliği saptanmış ve leptospirozun bir yaşından büyük erkek hayvanlarda daha yüksek oranlarda olduğu

belirlenmiştir. Bu veriler, köpeklerin *Leptospira* spp. için önemli bir kaynak olduğunu ve insanlara bulaşmada etkin rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, rutinde uygulanan tek doz leptospiroz aşısının, hayvanların çoğunda yeterli bağışıklığı sağlamadığı düşünülmüştür. *Leptospira* türlerinin günümüzdeki önemini anlaşılabilmesi, bu patojeni saptamak amacı ile kullanılacak olan uygun tanı yöntemlerinin belirlenmesi, aşılamanın saçılım üzerine olan önleyici etkilerinin değerlendirilebilmesi ve temelde zoonoz karakterli olan bu infeksiyon etkeninin, insan sağlığını tehdit edecek yönlerinin anlaşılabilmesi amacı ile; daha çok olgu sayısını içeren, prospektif temelde dizayn edilmiş ve tedavi seçeneklerinin de değerlendirildiği daha geniş araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

## Kaynaklar

- Adler B, Moctezuma AP. (2010). *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 140, 287-296.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215, 403-410.
- Appelt S, Armougom F, Le Bailly M, Robert C, Drancourt M. (2014). Polyphasic analysis of a middle ages coprolite microbiota, Belgium. *PLoS One. Public Library of Science*. 9 (2), e88376.
- Arimitsu Y, Fukumura K, Shingaki Y. (1989). Distribution of leptospirosis among stay dogs in the Okinawa Islands, Japan: Comparison of the microcapsule and microscopic agglutination tests. *Br Vet J*. 145, 473-477.
- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeer RA, Meza-Brewster D, Korver H, Terpstra WJ. (1994). Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 32, 1894-1898.
- Bergmann M, Llewellyn JR, Hartmann K. (2017). Diagnosis of leptospirosis in dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 45(3), 170-177.
- Bergmann M, Llewellyn JR, Hartmann K. (2017). Epidemiology and prevention of leptospirosis in dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 45(3), 163-168.
- Cerri D, Ebani V, Fratini F, Pinzauti P, Andreani E. (2003). Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a diagnostic laboratory for leptospirosis from 1995 to 2001. *New Microbiol*. 26, 383-389.
- D'Andrea A, Martine YZ, Alduina R, Monteverde V, Molina CF, Vitale M. (2012). Comparison of two PCR methods for detection of *Leptospira interrogans* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107, 85-88.
- Ellis WA. (2015). Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 387, 99-137.

11. Everard COR, Jones CJ, Inniss VA, Carrington DG, Vaughan AW. (1987). Leptospirosis in dogs on Barbados. *Isr J Vet Med.* 43, 288-295.
12. Fraune C, Schweighauser A, Francey T. (2013). Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc.* 242, 1373-1380.
13. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. (2003). Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 222(9), 1230-1233.
14. Hartman EG. (1984). Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. *Zbl Bakt Hyg.* 258, 350-359.
15. Kim S, Lee DS, Suzuki H, Watarai M. (2006). Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in Canine Semen by Multiplex Nested PCR. *J Vet Med Sci.* 68, 615-618.
16. Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopfeisch R, Gruber AD, Nöckler K, Kohn B. (2017). Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 58(10), 582-588.
17. Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, Turba ME, Vezzali E, Gentilini F. (2007) Clinicopathologic Features and Outcome Predictors of *Leptospira interrogans Australis* Serogroup Infection in Dogs: A Retrospective Study of 20 Cases (2001–2004). *J Vet Intern Med.* 21, 3–10.
18. Meeyam T, Penperon T, Petchanok B, Pichpol D, Padungtod P. (2006). Seroprevalance and risk factors associated with leptospirosis in dogs. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37, 148-153.
19. Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. (2012). Effects of Recent *Leptospira* Vaccination on Whole Blood Real-Time PCR Testing in Healthy Client-Owned Dogs. *J Vet Intern Med.* 26, 149–152.
20. Murphy K. (2018). Dealing with leptospirosis in dogs. *Vet Rec.* 183(12), 384-385.
21. Özdemir V. (1998). Köpek serumlarının Leptospiroz yönünden mikroskopik aglütinasyon testi ve ELISA ile incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
22. Pinto PS, Libonati H, Lilenbaum W. (2017). A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health Prod.* 49(2), 231-238.
23. Prescott JF. (2008). Canine leptospirosis in Canada: A veterinarian's perspective. *Canadian Medical Association Journal.* 178, 397-398.
24. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS. (2010). Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29, 1305-1309.
25. Saad A, Phuong T, Pamela S, Howard CJ. (1997). A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. *J Vet Res.* 61, 15-20.
26. Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 56(3), 159-79.
27. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. (2002). A quantitative PCR (Taq-Man) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis.* 2, 13.
28. Ülgen M, Çetin C, Özdemir V, Büyükcoban M. (1997). Bursa İlindeki Sokak Köpeklerinde Leptospirozun Seroprevalansı. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 9, 109-114.
29. Venkataraman KS, Nedunchellian S, Ramadass P, Ramkrishna J. (1992). Serodiagnosis of canine leptospirosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J Vet Med.* 12, 37-38.
30. Ward MP, Glickman LT, Guptill LE. (2002). Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 1, 53-58.
31. World Health Organization (WHO). (2019). Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG). Erişim adresi: <https://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/>, Erişim tarihi: 20.08.2019.
32. Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM, Djadid ND. (2010). *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect Genet Evol.* 10(2), 273-277.

# Koyunlarda Postpartum Dönemde Vaginal Svap Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ve Antibiyogram

Ufuk Ülker<sup>1</sup>, Mürşide Ayşe Demirel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Deney Hayvanları Birimi, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AD, Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesi, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 11.09.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 08.12.2019

**Özet:** Koyunlarda uterus, doğum sonrası mikroorganizmaların invazyonuna karşı diğer hayvan türlerine göre daha dayanıklı olup bakteriyel eliminasyon hızla gerçekleşebilmektedir. Uterusun bu özelliğine karşın koyunlarda güç doğum, doğuma yardım girişimleri, ölü doğum, enfeksiyon kaynaklı abortuslar, uterus prolapsusu ve doğum esnasında hijyenik olmayan çevresel koşullar postpartum uterus enfeksiyonları için birer predispoze faktör olmaktadır. Koyunlarda postpartum dönemde uterus enfeksiyonu ile ilişkili birçok aerob ve anaerob mikroorganizma izole edilebilmektedir. Araştırmamızda, postpartum 15-30. günlerde 40 adet koyunun vaginal svap örneklerinden izole edilen bakteri türleri ve bu bakterilere karşı duyarlı/dirençli antibiyotiklerin belirlenmesi amaçlandı. Steril şartlar altında alınan svap örnekleri soğuk zincir altında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırıldı. Yapılan mikrobiyolojik ekimler sonrası 27 örnekte *Escherichia coli* (%71,2), 6 örnekte *Staphylococcus equorum* (%15,7) ve 5 örnekte miks (*E. coli* ve *S. equorum*; %13,1) mikroorganizma izole ve tanımlanmış olup izolatların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Antibiyogram sonucuna göre *E. coli* etkeninin ampicilin, gentamisin, penisilin, streptomisin, sülfonamid, neomisin, trimetoprim/sülfametaksazol, linkomisin, spektinomisin, trimetoprim, enrofloksasin, nalidiksik asit ve siprofloksasin gibi antibiyotiklere karşı dirençli, dördüncü kuşak sefalosporin grubu seftazidime ise duyarlı olduğu görüldü. *S. equorum* izole edilen kültürlerde ise nalidiksik asit harici yukarıda bahsedilen antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu dikkati çekti. Koyunlarda postpartum dönemde vaginal mikroorganizma identifikasyonu ve doğru antibiyotik seçimi reproduksiyonun devamlılığı için oldukça önemlidir. Bu çalışma ile koyunlarda postpartum dönemde vaginal svap örneklerinde *S. equorum* izole edildiği ilk kez ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyogram, Koyun, *Staphylococcus equorum*, Uterus, Vaginal svap

## Bacterial Isolation and Antibiogram from Vaginal Swap Samples during the Postpartum Period in Sheep

**Abstract:** The uterus in sheep is more resistant to invasion of microorganisms after parturition and bacterial elimination can occur rapidly compared to other animal species. In spite of this feature of the uterus, the distocia, assisted delivery, stillbirth or the infection-induced abortions, uterine prolapse and unhygienic environmental conditions are predisposing factor for development of postpartum uterine infections in sheep. Many aerobic and anaerobic microorganisms related to uterine infection can be isolated in the postpartum period in sheep. The aim of this study was to determine bacteria species isolated from vaginal swab samples of 40 sheep on between 15-30 days postpartum and antibiotic susceptibilities of these bacteria. Swab samples taken under sterile conditions were delivered to Etlik Veterinary Control Central Research Institute Microbiology Laboratory under cold chain. After microbiological analysis, *Escherichia coli* in 27 samples (71.2%), *Staphylococcus equorum* in 6 samples (15.7%), and both *E. coli* and *S. equorum* in 5 samples (13.1%) were isolated and identified. Antimicrobial susceptibility was determined by disc diffusion method. According to the antibiogram results, *E. coli* was resistant to antibiotics, including ampicillin, gentamicin, penicillin, streptomycin, sulphonamide, neomycin, trimetoprim/sulfamethoxazole, lincomycin, spectinomycin, trimetoprim, enrofloxacin, nalidixic acid, ciprofloxacin and susceptible to ceftazidime which is fourth generation cephalosporin group. It was noted that *S. equorum* was susceptible to other antibiotics mentioned above, except nalidixic acid. Identification of vaginal bacteria and appropriate antibiotic selection in postpartum period in sheep is very important for the continuity of reproduction. In the present study, *S. equorum* was isolated for the first time in vaginal swab specimens in the postpartum period in sheep.

**Key words:** Antibiogram, Sheep, *Staphylococcus equorum*, Uterus, Vaginal swap

## Giriş

Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon, hayvancılık işletmeleri için önemli bir unsurdur (LeBlanc 2008). Koyun yetiştiriciliği tüm dünya ülkelerinin ekonomisine çeşitli yönlerden katkı sağlamaktadır. Ancak ülkemizde koyunculuk işletmelerinde beklenen reproduktif performans hedeflerine ulaşamamakta ve bu bağlamda ciddi ekonomik kayıplar görülmektedir. Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, gün ışığının azalmaya başladığı dönemde siklik aktivite gösterirler. Aşım sezonu olarak kabul edilen bu dönemde gebelik şekillenmediği sürece, sezon sonuna kadar östrus ve ovulasyon aktivitesi düzenli aralıklarla (ortalama olarak 17 günde bir) tekrarlanmaktadır (Gray 2003; Braun 2007). Koyunlarda reproduktif sürü sağlığında amaç, her yıl aşım sezonunda yavru elde edilebilmesidir. Mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar oldukları için koyunlarda postpartum ilk östrus ve ovulasyonun görülmesi doğum mevsimiyle ilişkilidir. Günlerin uzamaya başladığı dönemde doğum yapan koyunlarda postpartum anöstrus aralığı uzarken, üreme sezonunda doğum yapanlarda ovaryum aktivitesi devam eder ve gebelik görülebilir. Bu nedenle, üreme mevsimindeki puerperal dönem ile reproduktif performans yakın ilişkilidir (Gottshall ve Hansen 1992; Gray ve ark. 2002; Hayder ve Ali 2008). Koyunlarda doğum sonrası puerperal dönem uterusun involüsyonu, endometriyumun yenilenmesi, ovaryumlarda siklik aktivitenin yeniden başlaması ve bakteriyel kontaminasyonun eliminasyonu aşamalarından oluşur. Koyunlarda erken postpartum dönemde düşük progesteron seviyesi ile uterus bakteriyel invazyona karşı dayanıklı olabilmekte ve bu nedenle bakteriyel eliminasyon hızla gerçekleşebilmektedir. Ancak, güç doğum, doğuma yardım girişimleri, ölü doğum, enfeksiyon kaynaklı abortuslar, uterus prolapsusu ve doğum esnasında çevresel koşulların iyi olmaması gibi nedenler postpartum uterus enfeksiyonları için birer predispoze faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Regassa ve Noakes 1999; Mobini ve ark. 2002; Tzora ve ark. 2002; Aziz ve ark. 2017). Koyunlarda postpartum dönemde en sık izole edilen bakteriler uterus enfeksiyonu ile ilişkili *Trueperella pyogenes* ve *E. coli*'dir (Lewis 2003; Mshelia ve ark. 2014; Aziz ve ark. 2017). Postpartum dönemde uterus enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla genellikle penisilin

ve tetrasiklin grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda belirtilen antibiyotiklere karşı direnç geliştiği bildirilmiştir. Koyunlarda normal vaginal flora üreme mevsiminde feromon etkisi yaratarak verimliliğe katkı sağlamaktadır. Ancak reproduktif organlardaki bir enfeksiyona bağlı lokal ya da sistemik antibiyotik kullanımı normal vaginal floranın yapısının bozulmasına neden olabilmektedir. Böylece vaginal floranın bozulması ile birlikte feromonların özelliğinin yitirilmesine ve üreme verimliliğinin azalmasına yol açmaktadır (Hussain ve ark. 2013; Öziş Altınçekiç ve Koyuncu 2018). Bu çalışmanın amacı, postpartum dönemdeki koyunların vaginal svap örneklerinden izole edilen bakteri türlerinin ve antibiyogram sonuçlarının ortaya konulmasıdır.

## Gereç ve Yöntem

### Hayvan Materyali

Bu çalışmada materyal olarak, Ocak 2019 tarihinde Ankara'nın Haymana ilçesi Esenköy köyünde damızlık koyun yetiştiriciliği yapan yarı açık bir işletmeden seçilen, doğum ve sonrası sürece ilişkin herhangi bir sorun yaşamamış Merinos ırkı 40 adet koyunun postpartum 15-30. günleri arasında steril şartlar altında toplanan vaginal svap örnekleri kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen 10 adet koyun 2 yaşlı (primipar), 15 adet koyun 3-5 yaş arası (multipar) ve 15 adet koyun 5 yaş üzeri (multipar) hayvanlardı.

### Mikrobiyolojik Muayene

Vaginal svap örneği için; koyunlarda kontaminasyonu engellemek amacıyla vulva dudakları ve rima vulva antiseptikli solüsyon ile dezenfekte edildi. Daha sonra aralanan vulva dudakları arasından steril koşullar altında transport medyumlu tüplere alınan vaginal svap örnekleri soğuk zincirde Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırıldı. Elde edilen örneklerden bakteri izolasyonu ve identifikasyonu standart yöntemlerle yapıldı. Bu amaçla, bakteri türlerinin ilk izolasyonu ve saflaştırılması amacıyla kanlı agar (%10 defibrine koyun kanı), Nutrient agar, Macconkey agar ve Nutrient broth kültür ortamları kullanıldı. Ekimi yapılan örnekler 37°C'de aerob ortamda 18-24 saat inkübe edildi. Belirtilen sürenin sonunda üreme görülmeyen kültürler 24



saat daha inkübasyona bırakıldı. Daha sonra mikroorganizma üreyen örneklerin identifikasyonları yapıldı. Üreyen kolonilerden saf kültür yapıp, biyokimyasal testleri uygulanarak (Vitek II'de) identifiye edildi. Ardından disk difüzyon test yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları tespit edildi

İzolatların ampisilin (10 µg), gentamisin (10 ug), penisilin G (10 µg), streptomisin (10 ug), sülfonamid (300 ug), neomisin (10 ug), trimetoprim-sulfametoksazol (25 ug), linkomisin (15 ug), spektinomisin (100 ug), trimetoprim (5 ug), seftazidim (30 ug), enrofloksasin (5 ug), nalidiksik asit (30 ug) ve siprofloksasin (5 ug) olmak üzere 14 antibiyotik diski kullanılarak dirençlilik/duyarlılık durumları değerlendirildi. Bu amaçla, "Clinical and Laboratory Standards Institute" tarafından önerilen standart disk difüzyon tekniği kullanıldı (Clinical and Laboratory Standards Institute 2013).

## Bulgular

Mikrobiyolojik analizde 38 vaginal svap örneğinde bakteri izole edilirken, 2 svap örneğinde üreme olmadığı görüldü. Çalışma kapsamında, postpartum 15-30. günler arası 40 koyun vaginal svabından yapılan etken izolasyon oranı %95 olarak saptandı. İzole edilen bakteriyel etkenler 27 örnekte *E. coli* (%71,2), 6 örnekte *S. equorum* (%15,7) ve 5 örnekte miks (*E. coli* ve *S. equorum*; %13,1) kültür olarak belirlendi. Disk difüzyon test yöntemi ile yapılan antibiyogram sonucuna göre *E. coli* etkeninin ampisilin, gentamisin, penisilin, streptomisin, sülfonamid, neomisin, trimetoprim/sülfametoksazol, linkomisin, spektinomisin, trimetoprim, enrofloksasin, nalidiksik asit ve siprofloksasin gibi antibiyotiklere karşı dirençli, dördüncü kuşak sefalosporin grubu seftazidime ise duyarlı olduğu görüldü. *E. coli* suşları aynı işletmeden alındığı için tüm suşları aynı antibiyotik dirençliliği gösterdi. Ayrıca, *S. equorum* izole edilen kültürlerde nalidiksik asit harici yukarıda bahsedilen antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu belirlendi (Tablo 1). Antibiyogram sonucundan elde edilen verilere göre, *E. coli* 14 antibiyotik diskinden %7,14'üne, *S. equorum* ise %92,85'ine karşı duyarlılık göstermiştir.

**Tablo 1.** İzole edilen bakterilerin antibiyogram sonuçları

	<b>Escherichia coli</b>	<b>Staphylococcus equorum</b>
Ampisilin	Dirençli	Duyarlı
Gentamisin	Dirençli	Duyarlı
Penisilin	Dirençli	Duyarlı
Streptomisin	Dirençli	Duyarlı
Sülfonamid	Dirençli	Duyarlı
Neomisin	Dirençli	Duyarlı
Trimetoprim-Sulfametoksazol	Dirençli	Duyarlı
Linkomisin	Dirençli	Duyarlı
Spektinomisin	Dirençli	Orta Derecede Duyarlı
Trimetoprim	Dirençli	Duyarlı
Seftazidim	Duyarlı	Duyarlı
Enrofloksasin	Dirençli	Duyarlı
Nalidiksik asit	Dirençli	Dirençli
Siprofloksasin	Dirençli	Duyarlı

## Tartışma ve Sonuç

Koyunlarda, normal veya güç doğum sırasında ve sonrasında oluşan negatif basınç etkisiyle veya doğuma yardım girişimlerinin ardından uterusun mikroorganizmalar tarafından kontamine olması sonucu postpartum uterus enfeksiyonları görülmektedir. Bu patojenik mikroorganizmaların uterus mukozasına yerleşmesi, epitel tabakaya kolonize olması ve toksin üretmesi ile uterus enfeksiyonu kaçınılmaz hale gelir. Çiftlik hayvancılığının önemli bir bölümünü oluşturan koyun yetiştiriciliğinde üreme verimi düşüklüğünün nedenleri çoğu kez ortaya konulamamaktadır. Postpartum dönemde görülen uterus enfeksiyonları önemli fertilitite kayıplarına neden olmaktadır. Uterus enfeksiyonlarında infertilitenin nedenleri, graaf folikülün gelişmemesi, ovulasyon bozukluğu ve uterusun yapısının bozulmasına bağlı embriyonik kayıplardır (Tzora ve ark. 2002; Lewis 2003; Braun 2007). Bu bağlamda, uterus enfeksiyonuna neden olan bakteri ya da bakterilerin ortaya konulması ve uygun tedavi protokolünün belirlenmesi koyunlarda fertilitenin devamlılığı açısından önem arz etmektedir.

Uterus enfeksiyonlarının temel nedeni doğum sonrası mikroorganizmaların asendan olarak ute-

rin kaviteye ulaşmasıdır. Koyunlarda erken postpartum dönemde *T. pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Streptococci* ve *Clostridium* türleri gibi birçok aerobik ve anaerobik bakteri identifiye edilse de genellikle *T. pyogenes* ve *E. coli* izole edildiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, uterus enfeksiyonlarında *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus uberis* ve *E. coli* gibi çevresel mikroorganizma kontaminasyonunun daha fazla sorumlu olduğu bildirilmiştir (Tzora ve ark. 2002; Lewis 2003; Aziz ve ark. 2017). Bu çalışmada ise, postpartum 15-30. günler arası alınan vaginal svap örneklerinden hem anaerob (%71,2 *E. coli*) ve aerob (%15,7 *S. equorum*) hem de miks (*E. coli* ve *S. equorum*; %13,1) bakteri izolasyonu olduğu dikkati çekti. Bu çalışmada, diğer araştırmacılardan farklı olarak postpartum dönemde koyun vaginal svap örneklerinde ilk kez *S. equorum* izole edildiği görülmüştür.

Koagulaz negatif Stafilokok ailesinden olan *S. equorum* hayvanlarda deri, deri bezleri ve mukoz membranlarda yerleşik olan bakterilerdir. Hayvanlarda *S. equorum* gibi koagulaz negatif Stafilokoklar normal floranın bir parçası olup düşük virülensli olarak kabul edilse de birçok enfeksiyonun etiolojisine dahil oldukları belirlenmiş ve antibiyotik direncine yönelik artan eğilimler gösteren önemli patojenler olarak tanımlanmışlardır. Koyun sütlerinden sıklıkla izole edilen bakteriler arasında olan *S. equorum* novobiasin dirençli koagulaz negatif Stafilokoklar olarak bilinmektedirler (Nováková ve ark. 2006). Bu bilgiler ışığı altında, Stafilokoklar arasında *S. aureus* dışında enterotoksin oluşturdugu bilinen *S. equorum*'un (Jeong ve ark. 2017) koyunlarda infertiliteye neden olabilecek bir patojenite oluşturabileceği düşünüldü.

Antibiyotikler birçok enfeksiyonun tedavisinde genellikle ampirik olarak başlanmaktadır. Bu amaçla kinolonlar, aminopenisilinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar, trimetoprim-sulfametoksazol, aminoglikozidler, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler sıklıkla tercih edilen antibiyotikler arasında yer almaktadır. Ancak bu antibiyotiklere karşı giderek direnç geliştiği bildirilmektedir. *E. coli* gibi gram negatif bakterilerin beta-laktam halkası içeren antibiyotiklere karşı direnci beta-laktamaz üretimi ile olmaktadır. Bununla birlikte, bakterinin kazanmış olduğu direnci olduk-

ça kolay bir şekilde diğer mikroorganizmalara yayabildiği de bilinmektedir. Ayrıca, meydana gelen antibiyotik dirençliliği, antibiyotik seçiminde ve tedavinin etkinliğinde de başarısızlığa yol açmaktadır (Hashemi ve ark. 2018; Pormohammad ve ark. 2019). Hayvancılık işletmelerinde uterus enfeksiyonlarına karşı mücadelede mikroorganizmaların izolasyonu ve tedavide etkin antibiyotik seçimi amacıyla antibiyogram yapılmasının önemli olduğu bilinmektedir. Postpartum uterus enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla tercih edilen antibiyotik seçiminde antibiyogramın bir diğer önemi de farklı bakteri türlerinde antimikrobiyal direnç gelişimini önlemektir (Quinn 1994). Bu çalışmamızdan elde edilen bulgular sonucunda, koyunlarda postpartum 15-30. günler arasında vaginal svap örneklerinde iki farklı mikroorganizma (*E. coli* ve *S. equorum*) izole edildiği ve bu mikroorganizmalara karşı farklı duyarlılık ve dirençlikte antibiyotik türleri olduğu dikkati çekmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile koyunlarda postpartum dönemde vaginal svap örneklerinde *S. equorum* izole edildiği ilk kez ortaya konulmuştur. Ayrıca postpartum uterus enfeksiyonlarının yönetiminde mikroorganizma izolasyonu ve bu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılmasının önemi vurgulanmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışmanın mikrobiyolojik değerlendirmeleri aşamasına katkı sağlayan Uzm. Veteriner Hekim Selahattin ŞEN'e teşekkür ederiz. Araştırmada yalnızca vaginal svap örnekleri kullanıldığı için etik kurul izini gerektmemektedir.

### Kaynaklar

1. Öziş Altınçekiç Ş, Koyuncu M. (2018) Importance of Characterization of the Vaginal Microbiota in Ewes and Nannies. *J Anim Prod.* 59, 59-65. DOI: 10.29185/hayuretim.336009
2. Aziz ZS, Albukhaty S. Abbood H.K. (2017) Prevalence and antibiotic resistance pattern of certain types of bacterial flora in uterine ewe's samples. *Karbala Int J Mod Sci.* 3, 259-266. DOI: 10.1016/j.kijoms.2017.08.002
3. Braun JrW. (2007) Periparturient infection and structural abnormalities. Youngquist RS. eds. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Second Edition. Philadelphia, WB Saunders. p. 572-574
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013) Performance standards for antimicrobial susceptibility test-

- ing; twenty-third informational supplement M100-S23. Wayne, PA.
5. Gottshall SL, Hansen PJ. (1992) Regulation of leucocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. *Immunology*. 76, 636–641.
  6. Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. (2002) Evidence that an absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout (UGKO) ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*. 124, 289–300. DOI: 10.1530/rep.0.1240289
  7. Gray CA, Stewart MD, Johnson GA, Spencer TE. (2003) Postpartum uterine involution in sheep: histoarchitecture and changes in endometrial gene expression. *Reproduction*. 125, 185–198. DOI: 10.1530/rep.0.1250185
  8. Hashemi B, Abdollahi M, Rafiei A, Pormohammad A, Ahanjan M, Moghadaszadeh M, Rashidian S. (2018) The comparison of MAMA PCR and SSCP PCR to study chromosomal resistance against Ciprofloxacin and Nalidixic acid in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog*. 120,181–186. DOI:10.1016/j.micpath.2018.05.005
  9. Hussain SO, Al-Zubaidi SF, Asofi M. (2013) Different Endometritis Treatments in Ewe: Comparative Study. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)* 3, 91-94
  10. Hayder M, Ali A. (2008) Factors affecting the postpartum uterine involution and luteal function of sheep in the subtropics. *Small Ruminant Res*, 79, 174–178. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2008.07.023
  11. Jeong DW, Heo S, Ryu S, Blom J, Lee JH. (2017) Genomic insights into the virulence and salt tolerance of *Staphylococcus equorum*. *Sci Rep*. 7, 5383. DOI:10.1038/s41598-017-05918-5
  12. LeBlanc SJ. (2008) Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J*. 176(1), 102-114. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.019.
  13. Lewis GS. (2003) Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol*. 1, 117. DOI: 10.1186/1477-7827-1-117
  14. Mobini S, Heath AM, Pugh DG. (2002) Theriogenology of sheep and goats. Pugh DG. eds. *Sheep and Goat Medicine*. First Edition. Philadelphia, WB Saunders. p. 129-186.
  15. Mshelia GD, Bilal VT, Maina VA, Okon K, Mamza SA, Peter ID, Egwu GO. (2014) Microbiological studies on genital infections in slaughtered ewes from tropical arid zone of Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 12, 18-22
  16. Nováková D, Sedláček I, Pantůček R, Stetina V, Svec P, Petrás P. (2006) *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *J Med Microbiol*. 55, 523-528. DOI: 10.1099/jmm.0.46246-0
  17. Pormohammad A, Nasiri MJ, Azimi T. (2019) Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist*. 12, 1181–1197. DOI: 10.2147/IDR.S201324
  18. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. (1994) *Clinical Veterinary microbiology*. Mosby-Year Book Europe Limited. First Edition. London, England, p.920
  19. Regassa F, Noakes DE. (1999) Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. *Vet Rec*. 144, 502-506. DOI: 10.1136/vr.144.18.502
  20. Tzora A, Leontides LS, Amiridis GS, Manos G, Fthenakis GC. (2002) Bacteriological and epidemiological findings during examination of the uterine content of ewes with retention of fetal membranes. *Theriogenology*. 57,1809-1817. DOI: 10.1016/s0093-691x(02)00684-2

## Samsun'da 2004-2019 Yılları Arasında İncelenen Köpek Meme Tümörleri

Nilüfer Kuruca, Mustafa Yavuz Gülbahar, Mahmut Sözman, Murat Yarım,  
Yonca Betil Kabak, Efe Karaca, Sinem İnal, Tolga Güvenç

*Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Samsun*

Geliş Tarihi / Received: 02.01.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 17.09.2019

**Özet:** Retrospektif olarak yapılan bu çalışmada, Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne getirilen farklı ırk ve yaşlardaki köpeklere meme tümörü teşhisi konulmuştur ve bunlar malign-benign durumu dikkate alınarak histopatolojik sınıflandırmalarıyla ilgili sayısal veriler bildirilmiştir. Söz konusu 2004-2019 yılları arasında yapılan surveyde vakalara ait özellikler ve tanıları önceki yapılan çalışmalarla karşılaştırılarak ayrıntılı olarak bildirilmiş ve sonuç olarak Samsun ilindeki köpek meme tümörleriyle ilgili bir insidans ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Histopatolojik tiplendirme, insidans, köpek meme tümörü, Samsun

### A Survey of Canine Mammary Tumors from 2004 to 2019 in Samsun

**Abstract:** In this study, which was conducted retrospectively, the mammary tumors were diagnosed in dogs from different races and ages that were brought to the Faculty of Veterinary Medicine at Samsun Ondokuz Mayıs University. The histopathological numerical data on classifications were reported by considering malign-benign status. In the survey that was conducted between 2004 and 2019, the characteristics and diagnoses of the cases were reported in detail compared with previous studies; and as a result, the incidence of dog mammary tumors in Samsun province was determined.

**Key words:** Canine mammary tumor, histopathological typing, incidence, Samsun

### Giriş

Meme bezi, bağ dokusu, damarlar ve sinirlerle çevrili alveol ve kanallardan oluşan, değişime uğramış apokrin ter bezidir. Köpeklerin genellikle beş çift meme bezi bulunur. Kranial bölgede bulunan iki çift meme bezi, kranial ve kaudal torasik meme bezi, orta bölgede bulunan iki çift meme bezi, kranial ve kaudal abdominal meme bezi, kaudal bölgede bulunan meme bezi ise inguinal meme bezi olarak isimlendirilir (Novosad 2003).

Köpeklerde deri tümörlerinden sonra en sık meme tümörleri görülmektedir (Moulton 1990; Rivera ve von Euler 2011). Meme tümörleri en sık dişi köpeklerde görülür, erkeklerde meme tümörlerine ender olarak rastlanır (Misdorp 2002; Saba ve ark, 2007). Dişi köpeklerde görülen meme tümörleri, tüm tümörlerin %42'sini oluşturur (Dorn ve ark. 1968; Johnson 1993). Dişi köpeklerde meme tümörü gelişme riski, diğer evcil hayvan türlerinin dişilerinde meme tümörü gelişme riskinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Schneider 1970; Brodey ve ark. 1983).

Meme tümörü gelişiminde yaş önemli bir faktördür. İki yaşından küçük köpeklerde meme tümörlerine ender rastlanır, meme tümörü görülme oranı 6-7 yaşlarından itibaren artış gösterir ve en sık görüldüğü yaş aralığı 8-11 yaştır (Taylor ve ark. 1976; Hashimoto ve ark. 2002; Zatloukal ve ark. 2005; Sontas ve ark. 2011). Birçok çalışmada kötü huylu tümöre sahip olan köpeklerin, iyi huylu tümöre sahip olan köpeklerden yaşça daha büyük olduğu bildirilmiştir (Sorenmo ve ark., 2009).

İrk predispozisyonu çalışmalara göre değişiklik göstermesine rağmen İspanyol cocker, poodle, terrier ve av köpeklerinde diğer ırklara göre daha fazla meme tümörü görülmektedir (Baştan ve Zonturlu, 2002). En düşük meme tümörü görülme oranı melezlerde, boxerlarda ve chihuahualarda olduğu belirtilmiştir (Dorn ve ark. 1968; Cohen ve ark. 1974; Brodey ve ark. 1983).

Köpeklerde meme tümörünün gelişiminde birkaç risk faktörü bulunur. Östrojen ve progesteron gibi hormonlara maruz kalma meme tümörü görülme olasılığını artırmaktadır. Kısırlaştırılmamış köpeklerde meme tümörü görülme oranı, kısırlaştırıl-



miş olanlardan 3 ila 7 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Mulligan 1975; Priester 1979; Hahn ve ark. 1992; Alenza ve ark. 2000). Köpek ve kedilerde yaşamın erken dönemlerinde yapılan ovaryohisterekтоми, hem iyi huylu hem de kötü huylu meme tümörlerine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (Lana ve ark. 2007).

Ev yapımı diyet ve kırmızı et yiyen köpeklerde meme tümörü görülme olasılığı, ticari diyetle beslenen köpeklere kıyasla daha fazla olduğu, 1 yaşından daha küçük köpeklerde görülen obezitenin, daha sonraki yaşlarda tümör gelişmesinde risk faktörü olabileceği belirtilmiştir (Sonnenschein ve ark. 1991; Alenza ve ark. 1998). Gebelik sayısı, yalancı gebelik geçmişi, düzenli östrus siklusu, doğum sayısı, yavruların sayısı ve büyüklüğü gibi faktörlerin meme tümörü gelişiminde ilgili olmadığı düşünülmüştür (Brodey ve ark 1966; Schneider ve ark 1969; Schneider 1970).

Bu çalışmanın amacı Ocak 2004- Temmuz 2019 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiş ve anabilim dalımızca incelenip tanısı konmuş köpek meme tümörlerinin yıllara göre dağılımı, toplam köpek tümörleri içindeki oranı, ırk-yaşa göre dağılımı, meme tümörleri tiplerinin ve oranlarının karşılaştırılması ve Samsun ilinde köpek meme tümörlerinin insidensinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri ve Özel Veteriner Kliniklerinden Ocak 2004- Temmuz 2019 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen farklı ırk ve yaşlardaki 78 köpeğe ait meme dokusu biyopsi örneği oluşturdu. Gelen örnekler histopatolojik incelemeler için %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda 48 saat fikse edildikten sonra dokular rutin prosedürde alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek parafine bloklandı. Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlıkta kesitler alınarak bu kesitlere Hematoksilin & Eozin histokimyasal boyaması yapıldı ve ışık mikroskopunda (Nikon-Eclipse E600) incelendi.

## Bulgular

Ocak 2004- Temmuz 2019 yılları arasında köpeklerden alınıp, patoloji anabilim dalına gönderilmiş olan 224 adet tümör şüpheli örneklerin 78'inin (%34.8) meme tümörü olduğu tespit edildi. Köpeklerde teşhis edilmiş olan meme ve diğer tümörlerin yıllara göre dağılımları ve toplam örnek sayısı içindeki meme tümör oranları ile ilgili veriler Tablo 1'de verildi.

**Tablo 1.** Meme ve diğer tümörlerin 2004- 2019 yılları arasındaki dağılımları ve toplam tümör sayısı içindeki meme tümörü oranları

Yıl	Meme tümörü		Diğer tümörler	Toplam tümör	Meme tümörü
	Adet	%			
2004	1	1.28	2	3	33.33
2005	3	3.85	7	10	30.00
2006	2	2.56	4	6	33.33
2007	5	6.41	5	10	50.00
2008	7	8.97	7	14	50.00
2009	4	5.13	6	10	40.00
2010	2	2.56	1	3	66.67
2011	1	1.28	4	5	20.00
2012	2	2.56	2	4	50.00
2013	1	1.28	5	6	16.67
2014	3	3.85	13	16	18.75
2015	12	15.38	14	26	46.15
2016	4	5.13	19	23	17.39
2017	10	12.82	22	32	31.25
2018	16	20.51	24	40	40.00
2019	5	6.41	11	16	31.25
<b>Toplam</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>146</b>	<b>224</b>	<b>-</b>

Cinsiyeti kaydedilmiş olan 78 köpekten 76'sının (%98.7) dişi, 1'inin (%1.3) erkek olduğu belirlendi. Birinin ise cinsiyeti belirtilmemişti.

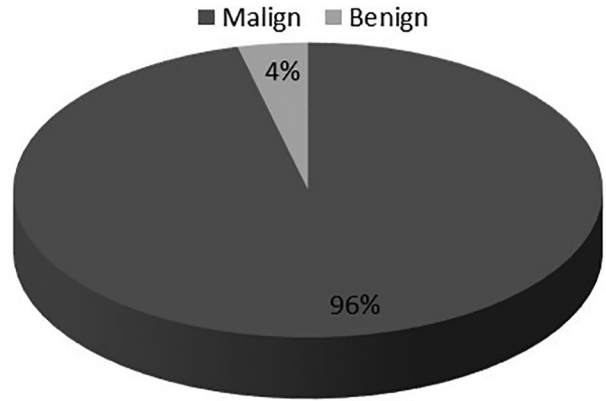
İncelenen 78 meme tümürlü köpeğin ırklara ve yaşa göre dağılımları Tablo 2'de sunuldu.

Dokuz köpeğin ırkı tespit edilemedi. Irkı tespit edilmiş olan 69 köpeğin 25'ini (%36.23) terrier, 11'ini (%15.94) melez, 7'sini cocker (%10.14) ırkı köpekler oluşturmuştur. Köpeklerden 7 tanesinin yaşı bilinmemektedir. Geriye kalan 71 köpeğin 31'i (%43.46) 9-12 yaş arası, 27'si (%38.03) 5-8 yaş arası, 10'u (%14.08) 13-16 yaş arası, 3'ü (%4.23) 1-4 yaş arasında olduğu tespit edildi (Tablo 2).

**Tablo 2.** Köpek meme tümörlerinin ırklara ve yaşlara göre dağılımı

İrklar	Yaş				Bilinmeyen	İrk Toplamı	
	1-4	5-8	9-12	13-16		Adet	%
Terrier	-	4	16	3	2	25	36.23
Melez	-	5	4	2	-	11	15.94
Cocker	-	2	4	1	-	7	10.14
Pointer	-	3	1	1	-	5	7.25
Golden Retriever	1	2	1	-	-	4	5.80
Setter	1	1	1	-	-	3	4.35
Poodle	-	1	1	-	-	2	2.90
Alman Çoban Köpeği	-	1	-	-	1	2	2.90
Pekingese	-	1	1	-	-	2	2.90
Pinscher	-	2	-	-	-	2	2.90
Rottweiler	-	-	-	-	2	2	2.90
Samoyed	-	-	-	1	-	1	1.45
Labrador	-	-	-	1	-	1	1.45
Pitbull	-	1	-	-	-	1	1.45
Dachshund	-	-	-	1	-	1	1.45
Bilinmeyen	1	4	2	-	2	9	-
<b>Adet</b>	<b>3</b>	<b>27</b>	<b>31</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>78</b>	<b>100</b>
<b>%</b>	<b>4.23</b>	<b>38.03</b>	<b>43.46</b>	<b>14.08</b>	<b>-</b>	<b>100</b>	<b>-</b>

Meme tümörü şüpheli materyallerin histopatolojik incelemesi yapıldığında, 3'ünün (%3.85) benign, 75'inin (%96.15) malign özellikler sergilediği belirlendi (Tablo 3). Benign özellik sergileyen 3 tümörün 2'sinin (%66.67) benign mikst tümör, 1'inin (%33.33) intraduktal papiller adenom olduğu görüldü. Malign özellik gösteren 75 tümörün, 23'ü (%30.67) kompleks karsinom, 22'si (%29.33) karsinosarkom (malign mikst tümör) olduğu tespit edildi. Kompleks karsinom ve karsinosarkom (malign mikst tümör)'ün terrier ırkı köpeklerde daha sık görüldüğü dikkati çekti.

**Grafik 1.** Malign ve benign tümörlerin yüzdeleri**Tablo 3.** Köpek meme tümörlerinin klasifikasyonu ve ırklara göre dağılımları

İRK	Terrier	Melez	Cocker	Pointer	Golden Retriever	Setter	Diğer İrklar	Bilinmeyen	Toplam Adet	%
<b>BENİGN</b>										
Benign mikst tümör	2	-	-	-	-	-	-	-	2	66.67
İntraduktal Papiller Adenom	1	-	-	-	-	-	-	-	1	33.33
<b>TOPLAM</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>3.85</b>
<b>MALİGN</b>										
Kompleks karsinom	8	1	2	4	-	-	6	2	23	30.67
Karsinosarkom (Malign Mikst Tümör)	7	4	1	-	3	1	2	4	22	29.33
Tubuler karsinom	1	1	2	-	-	-	-	1	5	6.67
Tubulopapillar karsinom	-	1	-	-	-	2	1	1	5	6.67
İnvaziv mikropapiller karsinom	-	-	2	-	-	-	3	-	5	6.67
Komedokarsinom	1	1	-	-	-	-	1	1	4	5.33
Mikst tip karsinom	1	1	-	1	-	-	-	-	3	4.00
Duktal karsinom	1	1	-	-	-	-	1	-	3	4.00
İntraduktal papiller karsinom	1	-	-	-	1	-	-	-	2	2.67
Adenoskuamöz karsinom	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.67
Karsinom ve malign miyoepitelyom	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<b>TOPLAM</b>	<b>22</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>75</b>	<b>96.15</b>

## Tartışma ve Sonuç

Günümüzde pet hayvan sahiplerinin en çok tercih ettiği türlerden biri olan köpeklerde çeşitli sebeplere (genetik faktörler, ırk yatkınlığı, beslenme, hormonal dengesizlikler vb.) bağlı olarak iyi veya kötü huylu meme tümörlerinde bir artış yaşanmaktadır. Ülkemizde bu konuda değişik zamanlarda yapılan çalışmalar sürdürülmüştür. Gün geçtikçe köpeklerde artan meme tümörü insidansı konuya daha fazla önem verilmesine ve sayısal verilerin ışığında ırk, yaş vb. faktörler ile kötü ya da iyi tümör tipleri arasında bir korelasyon kurulması için bilgiler sunulması ihtiyacını doğurmaktadır. Bu çalışmada da tüm dünyada olduğu gibi ülkemizdeki köpeklerde artan meme tümörü insidansı ile ilgili önceki yapılan çalışmaların ışığında, verilerin sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesine imkân tanıyacak şekilde Samsun iline ilişkin geniş bir zaman dilimini kapsayan veriler sunulmuştur.

Pamukcu ve Ertürk (1962)'ün 1933-1960 yıllarını kapsayan çalışmasında 106 köpek tümörünün 35'inin (%33), Ertürk ve ark. (1970)'ün 1964-1970 yıllarını kapsayan çalışmasında 52 köpek tümörünün 7'sinin (%13) meme tümörü olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde Köküuslu ve Akkayan (1972) tarafından 1968-1972 yılları arasında incelenen kedi ve köpek primer meme tümörlerinden, 11 tanesinin köpek meme tümörü olduğu belirlenmiştir. Erer ve Kıran (1993)'ün 1985-1992 yıllarını kapsayan çalışmasında 27 tümörlü köpeğe ait 34 tümör olayı ele alınmış ve bunlardan 11 (%32,4) tanesinin meme tümörü olduğu görülmüştür. Vural ve Aydın (2001)'in 1973-1998 yıllarını kapsayan çalışmasında ise 888 köpek tümörünün 236'sının (%26.5) meme tümörü olduğu saptanmıştır. Gülçubuk ve Gürel (2003)'ün 1995-2000 yılları arasında İstanbul'da saptanan 182 köpek tümöründen 52'sinin (%28.57) meme tümörü olduğu belirtilmiştir. Anabilim Dalımızda daha önceden yapılmamış olan bu geriye dönük çalışmada Ocak 2004-Temmuz 2019 yılları arasında incelenmiş olan 224 adet köpek tümörünün 78'inin (%34.82) meme tümörü olduğu belirlenmiştir.

Meme tümörleri 2 yaşın altındaki köpeklerde ender görüldüğü yaşın ilerlemesiyle birlikte meme tümörü görülme insidansında artış meydana geldiği, yaş ortalamasının yaklaşık 10-11 olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur (Zatloukal ve ark. 2005; Argyle ve ark. 2008; Sontas ve ark. 2009; Aydoğan

2010). Vural ve Aydın (2001)'in 1973-1998 yıllarını kapsayan çalışmasında 236 köpek meme tümörünün 62'si (%33.15) 5-8 yaş aralığı, 82'si (%43.85) 9-12 yaş aralığı, 36'sı (%19.26) 13-16 yaş aralığında olduğu belirtilmiştir. Mevcut çalışmada literatür bilgi ile uyumlu olarak 78 köpek meme tümörünün 3'ü (%4.23) 1-4 yaş aralığı, 27'si (%38.03) 5-8 yaş aralığı, 31'i (%43.66) 9-12 yaş aralığı ve 10 tanesinin (%14.08) 13-16 yaş aralığında olduğu tespit edilmiştir. Meme tümörünün en sık görüldüğü yaş aralığı 9-12 yaş olarak belirlenmiştir. 13-16 yaş aralığında meme tümörü görülme oranındaki azalmanın nedeni ise köpeklerin ortalama 10-13 yıl yaşam süresine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Aydoğan (2010)'ün tezinde 43 köpek meme tümörü olgusunun %41.02'si Terrier, %12.8'i Cocker, %12.8'ini melez ırkı köpeklerin oluşturduğu kaydedilmiştir. Çalışmamızda Tablo 2'de belirtildiği gibi ırkı bildirilen 69 olgunun 25'i Terrier (%36,23), 11'i Melez (%15,94), 7'si Cocker (%10,14), 5'i Pointer (%7,25), 4'ü Golden Retriever (5,80), 3'ü Setter (%4,35) ve geriye kalan 15'i (%21,75) ise 10 değişik ırk arasında görülmüştür. Terrier ırkında meme tümörü görülme oranının diğer ırklara kıyasla daha yüksek olmasının nedeni Samsun ve çevre illerde yaşayan insanların çoğunlukla Terrier ırkı köpekleri tercih etmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Vural ve Aydın (2001)'in 1973-1998 yıllarını kapsayan çalışmasında 236 meme tümörünün 68 (%28.8)'i benign, 168 (%71.2)'in malign karakterde olduğu tespit edilmiştir. Aydoğan (2010) tarafından incelenmiş olan 43 meme tümörünün hepsinin malign karakterde olduğu görülmüştür. Çalışmamızda 78 meme tümörünün 3'ü (%3.85) benign, 75'i (%96.15) malign karakterde olduğu ortaya konmuş (Grafik 1) olup, daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak malign tümör olguları benign tümörlere göre belirgin derecede yüksek oranda bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesine kliniklerden gönderilen tümör şüpheli biyopsi materyallerinde artış tespit edilmiştir. Özellikle meme tümörü insidansında belirgin artışın olması, böyle hayvanlarda yaşam süresinin kısalması-kalitesinin bozulması sebebiyle; malign tümör tiplerinin görüldüğü farklı ırk ve yaş dağılımı ile olası etiyolojik faktörlerin bir arada

değerlendirilmesi için bu alanda derinleşen kişilere yararlı bilgiler sunacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Alenza DP, Rutteman GR, Pena L, Beynen AC, Cuesta P. (1998) Relations between habitual diet and canine mammary tumours in case-control study. *J Vet Intern Med.*12(3), 132-139. doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02108.x
- Alenza MDP, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. (2000) Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract.*41(7), 287-291.
- Argyle DJ, Brearley MJ, Turek MM. (2008) Canine and Feline Mammary Tumors. Argyle DJ, Brearley MJ, Turek MM. eds. *Decision Making in Small Animal Oncology*. First Edition. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa. p.327.
- Aydoğan A. (2010) Köpek meme tümörlerinin tanısında histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler. Doktora Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Baştan A, Zonturlu AK. (2002) Köpek meme tümörlerinde yaş, ırk, tümör tipi ve yerleşim yeri arasındaki ilişkinin araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 49,203-206.
- Brodey RS, Fidler IJ, Howson AE. (1966) The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *J Am Vet Med Assoc.*149(8), 1047-1049.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. (1983) Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc.* 19(1), 61-90.
- Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H. (1974) Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res.*34 (11), 2859-2868.
- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. (1968) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda county. *J Natl Cancer Inst.* 40(2), 307-318.
- Erer H, Kiran MM. (1993) Konya'da 1985-1992 yılları arasında köpeklerde görülen tümörler. *SÜ Vet Fak Derg.*9(2), 87-89.
- Ertürk E, Tanzer F, Bulucu M. (1971) Patolojik Anatomi kürsüsünde 1964-1970 yılları arasında incelenen köpek ve kedi tümörleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*18(3-4), 383-386.
- Gülçubuk A, Gürel A. (2003) 1995-2000 yılları arasında İstanbul'da saptanan köpek tümörleri. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.* 29(1), 83-91.
- Hahn KA, Richardson RC, Knapp DW. (1992) Canine malignant mammary neoplasia: biologic behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *J Am Anim Hosp Assoc.*28, 251-256.
- Hashimoto S, Yamamura H, Sato T, Kanayama K, Sakai T. (2002) Prevalence of mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. *Japan Association for Social Informatics.* 2, 85-91.
- Johnson SD. (1993) Reproductive systems. Slatter D. eds. *Textbook of small animal surgery*. Second edition. Saunders, Philadelphia. p.2177-2192.
- Köküslü C, Akkayan C. (1972) Ankara'da 1968-1972 yılları arasında incelenen kedi ve köpeklerin primer meme tümörleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 19(4), 502-516. doi: 10.1501/Vetfak\_0000001951
- Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ. (2007) Tumors of the mammary gland. Withrow SJ, MacEwen BR. eds. *Small Animal Clinical Oncology*. Philadelphia, Saunders Company. p.455-477.
- Misdorp W. (2002) Tumors in Domestic Animals. Meuten D. eds. *Tumors of the mammary gland*. Ames, Iowa. p.575-607.
- Moulton JE. (1990) Tumours in Domestic Animals. Warren S, Walker K, Herman E. eds. *Tumours of the mammary gland*. University Press, California. p.518-552.
- Mulligan RM. (1975) Mammary Cancer in the Dog: a study of 120 cases. *Am J Vet Res.* 36(9), 1391-1396.
- Novosad CA. (2003) Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small Anim Pract.* 18(2), 107-109.
- Pamukçu AM, Ertürk E. (1962) Ankara'da köpeklerde görülen tümör çeşitleri, *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 9(1), 1-9. doi: 10.1501/Vetfak\_0000000380
- Priester WA. (1979) Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumor type, and geographical region from which reported. *J Small Anim Pract.*20(1), 1-11.
- Rivera P, von Euler H. (2011) Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol.* 48(1), 132-146. doi: 10.1177/0300985810387939.
- Saba CF, Rogers KS, Newman S, Mauldin GE, Vail DM. (2007) Biologic behavior and clinical characteristics of mammary gland tumors in male dogs. *J Vet Intern Med.* 21(5), 1056-1059.
- Schneider R. (1970) Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer.* 26(2), 419-426.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Nat Cancer Inst.* 43(6), 1249-1261.
- Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ. (1991) Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol.*133(7), 694-703.
- Sontas BH, Ozyogurtcu H, Gurel A, Ekici H. (2009) Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study. *Arch Med Vet.*41, 53-59. doi: 10.4067/S0301-732X2009000100007
- Sontas BH, Yüzbaşıoğlu Öztürk G, Toydemir TF, Arun SS, Ekici H. (2011) Fine-Needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. *Reprod Domest Anim.* 47(1), 125-130. doi:10.1111/j.1439 0531.2011.01810.x.
- Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA. (2009) Canine mammary gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 7(3), 162-172. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x.
- Taylor GN, Shabestari L, Williams J, Mays CW, Angus W, McFarland S. (1976) Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 36(8), 2740-2743
- Vural SA, Aydın Y. (2001) Ankara'da 1973-1998 yılları arasında incelenen köpek meme tümörleri. *Turk J Vet Anim Sci.* 25, 233-239.
- Zatloukal J, Lorenzova J, Tichy F, Necas A, Kecova H, Kohout P. (2005) Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Vet Brno.* 74(1), 103-109.



## ***Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum* için qPCR Tanı Kitinin Geliştirilmesi**

**Özlem Kardoğan<sup>1</sup>, Özlem Şahan Yapıcıer<sup>2</sup>, Kaan Müştak<sup>3</sup>, İnci Başak Müştak<sup>3</sup>, Arda Arman<sup>1</sup>, Gültekin Ünal<sup>4</sup>, Mustafa Kolukırık<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü-Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Bioeksen-Ar-Ge Teknolojileri Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye

**Geliş Tarihi** / Received: 09.10.2019, **Kabul Tarihi** / Accepted: 06.12.2019

**Özet:** Konak spesifik ve biovar olan *Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum* başta tavuk olmak üzere hindi, bildircin, güvercin, serçe ve papağanlarda önemli hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle kanatlı hayvanlarda bu serotipleri saptamak için hızlı ve güvenilir tanı yöntemleri hastalığın etkin kontrolü için gerekli olmaktadır. Bu amaçla biovarları saptamak ve birbirinden ayırımı sağlamak için eş zamanlı olarak *S. Gallinarum/Pullorum* ve internal kontrol hedefli reaksiyonları içeren hızlı qPCR tanı kiti geliştirildi. *S. Gallinarum/Pullorum* referans ve VKMAE Kanatlı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edilen *S. Gallinarum* suşlarına qPCR metodu uygulandı. Çalışmada qPCR analizinin duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirildi. Sonuçlar geliştirilen qPCR yönteminin *S. Gallinarum/Pullorum*'u kesin olarak saptayabildiğini gösterdi. qPCR yönteminin kullanım kolaylığı, güvenilirliği, teknik olarak basit, tam otomasyon, spesifik, hassas, hızlı olmasından dolayı bu biovarların teşhisi ve ayırımında daha fazla avantaj sağlayacağı sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** qPCR, *Salmonella*, tanı

### **Development of qPCR Diagnostic Kit for *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum***

**Abstract:** *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* cause important disease of chicken, the others are turkey, quail, pigeon, sparrow and parrot, which are host specific and biovars of each other. Therefore, rapid and reliable methods to detect these poultry-associated *Salmonella* serotypes are necessary for efficient control of *Salmonella* in poultry. For this purpose, a rapid qPCR diagnostic kit including *S. Gallinarum / Pullorum* and internal control targeted reactions was developed simultaneously to detect and differentiate biovars. *S. Gallinarum/Pullorum* reference and *S. Gallinarum* strains that were developed from VKMAE Poultry Laboratory were performed using qPCR method. In this study, sensitivity and specificity of qPCR analysis were evaluated. The results showed that the developed qPCR method was able to detect *Salmonella Gallinarum/Pullorum* correctly. Since the ease of use, reliability, technically simple, full automation, specific, sensitive and fast, the qPCR method is thought to provide more advantages in the diagnosis and differentiation of these biovars.

**Key words:** Diagnosis, qPCR, *Salmonella*

### **Giriş**

Kanatlı hayvanlarda *Salmonella enterica* sub-species *enterica* serovar *Gallinarum/ Pullorum* (*S. Gallinarum/Pullorum*) nedeni enfeksiyonlar, kanatlı tifosu ve pullorum hastalığı olarak tanımlanmaktadır (OIE 2018). Bu hastalıklar tavuk, hindi, bildircin, güvercin, serçe, papağan ve diğer süs kuşlarında görülmektedir. Pullorum hastalığı gençlerde görülmesine rağmen erginlerde de ortaya çıkmaktadır. Bulaşma kaynağını enfekte kanatlılar oluşturmakta ve vertikal bulaşma görülmektedir (Berchieri

ve ark. 2001). İnfekte civcivler kısa sürede ölürlere ve klokalar kirli ve beyaz renklidir, bazı durumlarda ölümlere daha sonraki haftalarda, genellikle de 2. ve 3. haftada rastlanır. Ergin hayvanlarda genellikle semptom görülmez ancak akut olgularda halsizlik, düşüklük, yumurta veriminde düşüş, ilk günlerde ateş, iştahsızlık ve 10 gün içinde ölüm izlenebilir. Kronik olgularda bu semptomları izlemek mümkün değildir. Buna karşın lokalize formları görülür. Etkenin virulansına ve sürünün direncine göre pullorumda mortalite %0-100, tifoda ise %10-93 arasında değişmektedir (Akan 2008). Bu hastalık

lar uygulanan ulusal kontrol programları sayesinde Kanada, Avustralya, Japonya, Kuzey Amerika, Birleşik Krallık ve bazı Batı Avrupa ülkelerinden eradike edilmesine rağmen Afrika, Asya, Kuzey ve Orta Amerika ülkelerinde halen önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Jones ve ark. 2001).

White-Kauffmann-Le Minör şemasının D serogrubunda (O antijenleri 1, 9, 12 sahipken; flagellar antijeni bulunmaz: -,-) yer alan *S. Gallinarum*/*Pullorum* aynı serovarin biyotipleri olarak kabul edilirler ve serotiplendirme ile birbirinden ayıramazlar (Barrow ve ark. 2011). Günümüzde bu iki biovarın, dulsetol ve ornitin dekarboksilaz gibi biyokimyasal testleri temel alan biyotiplendirme yöntemi ile ayırımı gerçekleştirilmektedir (Trabulsi ve Edwards 1962; Christensen ve ark. 1992; Shivaprasad 2008).

Moleküler çalışmaların yanında günümüzde hala ISO 6579-1:2017 *Salmonella* izolasyon ve identifikasyon prosedürü altın standarttır (Le Minör 1992; ISO 2007, 2012). Tüm prosedürün tamamlanması için geçen süre yaklaşık 11 gündür ve yoğun emek ve tecrübeli personel isteyen bu yöntemi kısaltmak için moleküler tabanlı birçok hızlı tanı yöntemi geliştirilmiştir (Bohaychuck ve ark. 2007; Soria ve ark. 2012). Yüksek sensitivite, spesifite ve zamanı kısaltmasından dolayı tercih edilen metotlar konvansiyonel PCR ve real-time PCR teknikleri olmuştur (Ellingson ve ark. 2004; Malorny ve ark. 2004; Hein ve ark. 2006; Josefsen ve ark. 2007). Bu testler arasında yer alan kantitatif real-time PCR (qPCR) yöntemi ise bu iki biovarın teşhisinde kullanılan hızlı, güvenilir, ucuz ve duyarlı yöntemlerin başında gelmektedir (Kisiela ve ark. 2005). Bu çalışmada, *S. Gallinarum*/*Pullorum* biovarlarının hem tanısını koymak hem de birbirinden ayırt etmek için qPCR tabanlı hızlı tanı kiti geliştirilmesi ve optimizasyonu amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

**Standart bakteri suşları:** Çalışma kapsamında *Salmonella Gallinarum* NCTC 13346, *Salmonella Pullorum* NCTC 10704 pozitif kontrol; *Salmonella Enteritidis* NCTC 12694 ve *Salmonella Typhimurium* NCTC 74 negatif kontrol suşu olarak kullanılmak üzere Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Ulusal *Salmonella* Referans Laboratuvarı'ndan temin edildi.

**Genomik DNA izolasyonu:** DNA ekstraksiyonları ticari DNA ekstraksiyon kiti ile DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, USA) üreticinin açıklamalarına göre yapıldı. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

**Primer ve prob tasarımı:** Standart suşlara ait National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank'dan elde edilen tüm genom dizileri Clustal-O (Clustal-Omega) yazılımıyla hizalanarak *Salmonella enterica* türüne ait tüm serotiplerde bulunan korunmuş bölgeler belirlendi (Kang ve ark. 2011). *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum*'u ayırımı için *glgC* ve *speC* gen bölgelerine spesifik primer, prob ve inhibitörlere bağlı yanlış negatifliği ortadan kaldırmak için internal kontrol primerleri (IAC) tasarlandı (patent aşamasında). Spesifik dizi hedeflenerek primer ve prob tasarımları manuel olarak yapıldı (Dorak 2007). Tasarlanan primer ve prob *in-silico* olarak BLAST tarama motorunda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) incelenerek spesifiteleri belirlendi.

**qPCR Koşulları:** Real-time PCR analizlerinde primer ve prob kullanılarak yer alan PCR karışımı (patent aşamasında) hazırlandı (Tablo 1). Nükleik asit amplifikasyonları FAM-HEX kanallı Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak 95°C 5 dak ön denatürasyon, 40 döngü 95°C 15 sn denatürasyon, 65°C 50 sn bağlanma ve uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Analiz eş zamanlı olarak FAM kanalında *S. Gallinarum*/*Pullorum*, HEX kanalında ise IAC hedefli reaksiyonların olduğu qPCR yapılarak geliştirildi.

Real time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanarak değerlendirildi. Sigmaoidal eğriye sahip ve Ct ≤ 37'de belirgin logaritmik faz gösteren amplifikasyon doğrudan pozitif olarak değerlendirildi.

FAM kanalında gerçekleştirilen reaksiyonların her ikisi de pozitif sonuçlanırsa; DNA'nın *S. Gallinarum* biovar *Gallinarum*, *S. Pullorum*/*Gallinarum* (SP/SG) hedefi pozitif, nonspesifik hedef negatif sonuçlanırsa; DNA'nın *S. Pullorum*'a olduğu sonucuna varıldı. Her iki reaksiyonun da negatif sonuçlanması halinde, negatif örneğin *S. Pullorum* veya *S. Gallinarum* olmadığı sonucuna varıldı.

**Tablo 1.** qPCR amplifikasyon kurulum bileşenleri

	qPCR Bileşenleri				
	IAC	G/P	non-spesifik	negatif kontrol	pozitif kontrol
Renksiz 2X qPCR mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Oligomix ( <i>S. Gallinarum</i> /Pullorum)	-	3 µL		3 µL	3 µL
Oligomix (non-spesifik)	-	-	3 µL	-	-
Oligomix (IAC)	3 µL	-	-	-	-
Negatif kontrol	-	-	-	2 µL	-
Non-spesifik DNA	2 µL	2 µL	2 µL	-	-
<i>S. Gallinarum</i>	-	-	-	-	2 µL
IAC	1 µL	-	-	-	-
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>11 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>

qPCR: Kantitatif real-time PCR; IAC: İnternal kontrol; G/P: Gallinarum/Pullorum

**Spesifite ve sensitivitenin tespiti:** Metodun spesifite ve sensitivitesi iki aşamada yapıldı; Birinci aşamada *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* standart suşlara ait DNA'ların 10 katlı dilüsyonları yapıldı. İkinci aşamada ise 12 adet *S. Liverpool*, 11 adet *S. Virchow*, 10 adet *S. Enteritidis*, *S. Infantis* ve *S. Anatum*, 5 adet *S. Senftenberg* ve *S. Agona*, 1 adet *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Avibacterium paragallinarum* suşlarına ait DNA'lar ile İnfeksiyöz Bronşitis (IB) ve Newcastle hastalığı (ND) viruslarına ait RNA'lar kullanıldı. Her iki aşamada kullanılan tüm DNA(sulandırılmalar dahil) ve RNA'lara qPCR tekniği uygulandı.

**qPCR tekniğinin validasyonu:** Validasyon çalışması için Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları biriminin katılmış olduğu uluslararası yeterlilik-karşılaştırma testlerinde (ring test) kullanılan 10 adet *S. Gallinarum* suşu kullanıldı.

## Bulgular

**qPCR metodu:** Standart suşların tamamı qPCR PCR ile de *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* olarak doğrulandı. Reaksiyonda negatif kontrol olarak kullanılan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ile yapılan qPCR'de amplifikasyon eğrisi göstermedi. Yapılan testler sonucunda internal kontrol primerlerinin inhibitörleri ortaya koymada başarılı olduğu belirlendi.

**Spesifite ve sensitivitenin belirlenmesi:** Metodun ilk aşamasında, DNA konsantrasyonlarındaki azalmayla birlikte Ct değerlerinde de kademeli olarak azalma belirlendi. qPCR sonucunda elde edilen Ct değerleri tablo 2'de gösterildi.

İkinci aşamada test edilen ve hedef dışı olan bakteri suşları ve virüslere ait DNA/RNA'lar ile yapılan qPCR çalışmasında sigmoidal eğriye rastlanılmadı.

**Tablo 2.** qPCR sonucunda elde edilen Ct değerleri

Biovar adı	Sulandırma oranı	G/P	Non-spesifik	IAC
<i>S. Gallinarum</i>	10 <sup>0</sup>	17,53	15,75	+
	10 <sup>-1</sup>	21,03	19,49	+
	10 <sup>-2</sup>	24,7	22,73	+
	10 <sup>-3</sup>	27,94	26,05	+
	10 <sup>-4</sup>	31,01	29,33	+
<i>S. Pullorum</i>	10 <sup>0</sup>	18,43	N/A	+
	10 <sup>-1</sup>	21,88	N/A	+
	10 <sup>-2</sup>	25,25	N/A	+
	10 <sup>-3</sup>	28,59	N/A	+
	10 <sup>-4</sup>	31,52	N/A	+
Negatif Kontrol	-	N/A	N/A	+

**Geliştirilen qPCR metodunun validasyonu:** Ring testte kullanılmış olan *S. Gallinarum* 10 adet suşla optimizasyon çalışması yapıldı. Hem SP/SG

hedefi hem de nonspesifik hedefinde sigmoidal eğriler görüldüğü için 10 adet suşun *S. Gallinarum* olduğu belirlendi.

## Tartışma ve Sonuç

*S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hareketsiz, konak spesifik ve genetik olarak birbiriyle yakın ilişkili olan biovarlardır (Löfstrom ve ark. 2010; Feng ve ark. 2013). Bu iki patojenin neden olduğu hastalık tablosu ve salgın nedenli oluşan hayvan ölümleri, ekonomik kayıplar ve diğer ülkelere yayılma riski nedeni ile Salgın Hastalıkları Ofisi (OIE) bildirim zorunlu hastalıklar içerisinde (OIE 2018). Tüm bu nedenler gözönüne alındığında *S. Gallinarum/Pullorum*'un teşhisinin ve biovarların birbirinden ayrımının erken dönemde ve doğru yapılabilmesi, ticari kanatlı işletmelerindeki uygulanacak kontrol stratejilerinin ortaya konması açısından önemli olmaktadır (Rubio ve ark. 2017).

*S. Gallinarum/Pullorum*'un moleküler tanısı için PCR temelli birçok çalışma bulunmaktadır (Christensen ve ark. 1993; Kisiela ve ark. 2005; Xiong ve ark. 2017). Günümüzde modern tanı metotları içerisinde değerlendirilen real-time PCR, kolaylıkla araştırmacılar ve rutin tanı laboratuvarlarında ulaşılabilir olmuştur. Bununla birlikte, bu teknik için spesifik problemlerin ve primerlerin tasarımı, genomik dizilerinin varlığına ve biyoinformatik analizine bağlı olduğundan dolayı uzmanlık gerekmektedir (Rubio ve ark. 2017).

Bu çalışmada, geliştirilen real-time PCR tekniğinin ilk aşaması hedef genlerin seçilmesidir. Bu amaçla *S. Gallinarum/Pullorum* için GenBank'ta bulunan gen diziler incelendi. Son yıllarda yapılan çalışmalarla da paralellik gösteren ornitin dekarboksilaz (*speC*) ve glikojen biyosententez (*glgC*) hedefli genler belirlendi (Kang ve ark. 2011, 2012). Bu gen bölgeleri haricinde farklı çalışmalarda *fimH* (Kisiela ve ark. 2005), *fliB* ve *fliC* (Paiva ve ark. 2009), *fliB* (Xiong ve ark. 2017), *ipaJ* (Xu ve ark. 2018) genleri hedefleyen moleküler metotlar kullanılarak *S. Gallinarum/Pullorum* tanısı yapılmıştır. Çalışmada geliştiren qPCR metodunda kullanmak üzere biovarlara ve internal kontrol primerlerinin öncelikle *in-silico* analizleri daha sonra laboratuvar ortamında *in-vitro* etkinlik testleri gerçekleştirildi. Bu durum her bir biovarın spesifik teşhisi için kulla-

nılan metottan elde edilen sonuçların kapsamlı analizini ve validasyonunu göstermektedir.

Ülkemizde kanatlı hayvanlarda (tavuk, hindi ve kafes kuşları) *Salmonella*'ların moleküler teşhisi için geliştirilen tanı yöntemleri çoğunlukla patojenin cins düzeyi için tercih edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda *invA*, *iroB* genlerinin hedef alındığı PCR, multipleks PCR ve qPCR metotları geliştirilmiş ve bu teşhis metotlarının hız, sensitivite, spesifikite, tekrarlanabilirlik açısından önemli avantajlar sağladığı sonuçlarına varılmıştır (Çarli ve ark. 2001; Eyigör ve Çarli 2003, 2007; Sareyyüopoğlu ve Cantekin 2009).

Bu çalışmada geliştirilen *S. Gallinarum/Pullorum* qPCR tanı kiti hem teşhise hem de biovarlar arasında ayrımı yapabildi. qPCR metodu iki gene dayandırıldı ve yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığı belirlendi. Çalışmanın validasyonu amacıyla Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları biriminden temin edilen 10 adet *S. Gallinarum*'un amplifikasyonunda hem SP/SG hedefi hem de nonspesifik hedefinde sigmoidal eğriler görüldü. Standart *S. Pullorum* suşlarıyla yapılan çalışmalarda SG/SP hedefinde sigmoidal eğriler görülürken nonspesifik hedefinde sigmoidal eğrilere rastlanılmayarak suşların bu yöntemle de *S. Pullorum* olduğu belirlendi. Bu çalışma benzer primer dizileri kullanılan *S. Gallinarum/Pullorum* ayrımına yönelik yaptıkları konvansiyonel dupleks PCR çalışmalarıyla paralellik göstermiştir (Kang ve ark. 2011, 2012). Bu çalışma için tasarlanmış olan probun özgül bir şekilde, standart eğrilerle, geniş bir dinamik aralıkta doğru bir şekilde *S. Gallinarum/Pullorum* ayrımını gerçekleştirdiği ve ölçülebildiği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum* ve biovar *Pullorum*'un tanısını koymak ve birbirinden ayırmak için *glgC* ve *speC* gen bölgeleri hedef alan qPCR tanı kiti geliştirildi. Geliştirilen kit, biovar *Gallinarum* ve biovar *Pullorum*'u (%100 duyarlılık) doğru bir şekilde tanımladı ve hedef dışı olan suşlar (% 100 özgüllük) negatif olarak tespit etti. Bu tanı kiti ile veteriner tanı laboratuvarlarında Kanatlı tifosu ve *Pullorum* hastalığının hızlı şekilde ayırıcı tanısı yapılabilecektir.



## Kaynaklar

- Akan M. (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. *Mektup Ankara*. 6, 3-4.
- Barrow PA, Freitas Neto OC. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol*. 40: 1-13.
- Berchieri JRA, Murphy CK, Marston K, Barrow PA. (2001). Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol*. 30, 229-239.
- Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK, Render DG. (2007). A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food-animal matrices. *J Food Prot*. 70, 1080-1087.
- Christensen JP, Olsen JE, Hansen HC, Bisgaard M. (1992). Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathol*. 21,461-470.
- Christensen JP, Olsen JE, Bisgaard M. (1993). Ribotypes of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. *Avian Pathol*. 22,725-738.
- Çarlı KT, Ünal CB, Caner V, Eyigör A. (2001). Detection of *Salmonella* chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 39, 1871-1876.
- Dorak TM. (2007). Real-Time PCR. New York, NY, USA: Taylor&Francis.
- Eyigor A, Carli KT. (2003). Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Dis*. 47, 380-386.
- Eyigor A, Carli KT. (2007). A PCR-ELISA for the detection of *Salmonella* from chicken intestine. *J Biol Environ Sci*. 1, 45-49.
- Ellingson JL, Anderson JL, Carlson Sa, Sharma VK. (2004). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol Cell Prob*. 18, 51-57.
- Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. (2006). Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J Microbiol Methods*. 66, 538-547.
- Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Rådström P, De Medici D, Abdulmawjood A, Fach P. (2003). Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *J Clin Microbiol*. 41, 5835.
- Feng Y, Johnston RN, Liu G, Liu S. (2013). Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction. *PLoS ONE*. 8, 1-6.
- ISO. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (ISO 6579:2002/A1:2007). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. (2012). Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique (EN ISO/TS 6579-2). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. (2001). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infect Immun*. 69, 5471-5476.
- Josefsen MH, Krause M, Hansen F, Hoorfar J. (2007). Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Appl Environ Microbiol*. 73, 3040-3048.
- Kang MS, Kwon YK, Jung BY, Kim A, Lee KM, An BK, Song EA, Kwon JH, Chung, GS. (2011). Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. *Vet Microbiol*. 147, 181-185.
- Kang MS, Kwon YK, Kim HR, Oh JY, Kim MJ, An BK, Shin EG, Kwon JH, Park CK. (2012). Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet Microbiol*. 160, 491-495.
- Kisiela D, Kuczkowski M, Kiczak L, Wieliczko A, Ugorski M. (2005). Differentiation of *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum from *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum by PCR-RFLP of the *fimH* gene. *J Vet Med B*. 52, 214-218.
- Le Minör L. (1992). The Genus *Salmonella*. In: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, Ed.: Balows A, Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. 2nd Ed., Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 2760-2774.
- Löfström C, Hansen F, Hoorfar J. (2010). Validation of a 20-h real-time PCR method for screening of *Salmonella* in poultry faecal samples. *Vet Microbiol*. 144, 511-514.
- Malorny B, Paccasoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol*. 70, 7046-7052.
- OIE. (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Fowl Typhoid and Pullorum Disease, Bölüm 2.3.11.
- Paiva JB, Cavallini JS, Silva MD, Almeida MA, Angela HL, Berchieri JA. (2009). Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. *Brazilian J Poult Sci*. 11, 271-276.
- Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, Smedt JD, Zutter LD. (1999). Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *Int J Food Microbiol*. 46, 37-44.



28. Rubio S, Antonio R, Penha, C, Maria A, Almeida D, Junior AB. (2017). Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum*. *Avian Pathol.* 46, 644-651.
29. Sareyyüpoğlu B, Cantekin Z. (2009). Use of a multiplex-polymerase chain reaction for detection of *Salmonella* and *Chlamydophila psittaci* from caged birds. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 56, 269-273.
30. Shivaprasad HL. (2008). Pullorum disease and fowl typhoid Y.M. Siaf (Ed.), Diseases of poultry, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 568-582.
31. Schoder D, Schmalwieser A, Schaubberger G, Kuhn M, Hoorfar J, Wagner M. (2003). Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clin Chem.* 49, 960-963.
32. Soria MC, Soria MA, Bueno DJ. (2012). Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poult Sci.* 91, 616-626.
33. Trabulsi LR, Edwards PR. (1962). The differentiation of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* by biochemical methods. *Cornell Vet.* 52, 563-569.
34. Xiong D, Song L, Tao J, Zheng H, Zhou Z, Geng S, Pan Z, Jiao X. (2017). An efficient multiplex PCR-based assay as a novel tool for accurate inter-serovar discrimination of *Salmonella* Enteritidis, *S. Pullorum/Gallinarum* and *S. Dublin*. *Front Microbiol.* 8,420-429.
35. Xu LJ, Liu ZJ, Li Y, Yin C, Hu YC, Xie XL, Li QC, Jiao XA. (2018). A rapid method to identify *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum using a specific target gene ipaJ. *Avian Pathol.* 47, 238-44.

## Sıcaklık Stresi ile İndüklenen Broilerde Farklı Oranlarda Uygulanan Bitkisel Ekstraktların Bazı Kan Parametrelerine Etkisinin İncelenmesi

Bülent Bayraktar<sup>1</sup>, Emre Tekce<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bayburt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Bayburt, Türkiye

<sup>2</sup>Bayburt Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Yüksek Okulu, Bayburt, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 19.06.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 13.11.2019

**Özet:** Sıcaklık stresi, immunosupressif etkisi nedeniyle kanatlılarda büyüme ve gelişme geriliği, metabolik problemlerden ölüme kadar varabilen sağlık sorunlarına yol açan önemli bir stres etmenidir. Bu çalışma, sıcaklık stresine maruz kalan kanatlılarda bitkisel ekstrakt kullanımına bağlı olarak serumda P düzeylerinin karşılaştırılmasının yanı sıra eş zamanlı olacak şekilde içme sularına ilave edilen stresin etkisini azaltılmasında antioksidan özelliklere sahip *Eucalyptus glabatus labii* (ökalıptus), *Tymus vulgaris* (kekik), *Cymbopogon nardus* (sitronella) ve *Syngium aromaticum* (karanfil) bitkilerinden oluşan uçucu yağ karışımının (EOM) bazı kan parametreleri (Fosfor (P), Lipaz, Sodyum (Na), Klor (Cl), Doymamış demir bağlama kapasitesi (UBİC), Total Demir Bağlama Kapasitesi (TIBC), Transferin Doygunluğu (% SAT) düzeyi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Araştırmada her birinde 50 adet hayvan olacak şekilde 8 gruba ayrılmıştır. Gruplar kendi içerisinde her bölmede 10 adet hayvan olacak şekilde 5 alt grubu içermektedir. UIBC ve TIBC düzeyleri kontrol grubuna kıyasla 22°C gruplarda 500 ml/1000 l gruplarda en fazla artış gözlenirken, 36°C gruplarda ise 500 ml/1000 l gruplarda en fazla azalma tespit edilmiştir (p<0,05). Deney sonucunda gruplara ait veriler incelendiğinde sıcaklık stresine maruz kalan broylerin içme suyuna ilave edilen EOM'un serumda P, Lipaz, Na, % SAT düzeyleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).

**Anahtar kelimeler:** Bitki ekstraktı, broyler, kan parametreleri, sıcaklık stresi

### Investigation of the Effect of Vegetable Extracts on Some Blood Parameters in Broiler Exposed by Heat Stress

**Abstract:** Heat stress, growth and developmental retardation in poultry due to its immunosuppressive effect is an important stress factor leading to health problems ranging from metabolic problems to death. In this study, we compared the phosphorus levels in serum due to the use of herbal extracts in poultry subjected to temperature stress, as well as the effect of the stress added to drinking water simultaneously on the effect of antioxidant properties *Eucalyptus glabatus labii* (eucalyptus), *Tymus vulgaris* (thyme), *Cymbopogon nardus* (citronella) ve *Syngium aromaticum* (clove) (EOM) of some blood parameters (phosphorus (P), lipase, Sodium (Na), Chlorine (Cl), Unsaturated Iron Binding Capacity (UBIC), Total Iron Binding Capacity (TIBC), Transfer Saturation (% SAT)) the effect on the level of was investigated. The study was divided into 8 groups with 50 animals each. The groups consist of 5 sub-groups with 10 animals in each compartment. In the 22 °C groups, there was an increase in UBIC and TIBC parameters in the groups given EOM mixture compared to the control group, while the maximum increase was seen in 500 ml/1000 l groups. UIBC and TIBC levels were the highest increase in the 500 ml / 1000 l groups in the 22 °C groups compared to the control group, while the highest decrease was observed in the 500 ml / 1000 l groups in the 36 °C groups (p < 0,05). At the end of the experiment, it was found that EOM added to drinking water of broiler exposed to heat stress did not have a significant effect on serum P, Lipase, Na, % SAT levels (p > 0,05).

**Key words:** Blood parameters, broiler, heat stress, plant extract

### Giriş

Kanatlılarda önemli bir stres etmeni olan sıcaklık stresi, fizyolojik, hormonal, davranışsal değişikliklere yol açan immunosupressif etkisi nedeniyle büyümede yavaşlama ve mortalite oranında artışa yol açmaktadır (Al-Marzooqi ve Leeson 1999; AOAC 2005; Abdulkarimi ve Daneshyar 2012). Bu etkileri

nedeniyle ekonomik olarak kanatlı sektörünün başlıca önemli sorunları arasında yer almaktadır.

Stres, biyokimyasal parametrelerin değişiminde önemli bir etmendir (Al-Marzooqi ve Leeson 1999). Fosfor, büyüme-gelişmeden, kemik formasyonu, hormon aktivasyonu, hücre metabolizması ve hücreler arası sinyal iletimi, asit-baz dengesine

kadar pek çok fizyolojik süreçte önemli rolü bulunan, bütün hayvan türleri için esansiyel ve yaşam için vazgeçilmez bir öneme sahip bir elementtir (Asimov 1974; Moraesa ve ark. 2003). Sıcaklık stresine bağlı olarak Broiler civciv ve tavuklarda, plazma inorganik fosfat seviyelerinin azaldığı bildirilmektedir (Borges ve ark. 2004; Conway ve ark. 2006). Ancak, broylerde sıcaklık stresi indüklenmesi ve bitkisel ekstrakt uygulamasına bağlı olarak serum P düzeyinin değişimine yönelik kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Plazmadaki P düzeyi, diyetle alınan P miktarı, hayvan türü, yaş, gibi birçok fizyolojik etmene bağlı olarak değişkenlik göstermekte ve serumdaki normal düzeyi 2,5-4,5 mg/dl aralığında değişkenlik göstermektedir. Bu oran 1,5 mg/dl altına düşmesi halinde ölüm riski artmaktadır (Nelson, 1967; Conway ve ark. 2006; Daneshyar ve ark. 2009). Ayrıca, hızla büyüme ve gelişme sürecindeki genç civcivler P eksikliğine aşırı duyarlılık göstermektedir. Bu nedenle, P'nin ideal değerlerinin bilinmesi, korunması ve takip edilmesi önem arz etmektedir. Fizyolojik açıdan bitkisel kaynaklarda bulunan P'nin fitik asit formunda bulunması nedeniyle kanatlılarda P'nin yararlanma derecesi oldukça düşük düzeydedir (NRC 1984; Conway ve ark. 2006). Kanatlı rasyonlarında P elementinin yetersizliği ve plazmadaki P düzeyi düşüklüğü, yumurta verimi ve kalitesinde de azalma, büyüme performansında gerileme gibi verim performanslarını olumsuz etkilenmesinin yanı sıra pıka, yağlı karaciğer, metabolik bozukluklar, raşitizm gibi genel durum bozukluklarından ölüm olgusuna kadar varabilen önemli bir sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Al-Marzooqi ve Leeson 1999). Diğer yandan, kanatlı rasyonlarında kullanılan P ve Ca miktarında hafif sapmaların ani ölüm görülme insidansını arttırılabilmesi açısından da kanatlı besleme programlarında kritik bir öneme sahiptir (Al-Marzooqi ve Leeson 1999; Dorman ve Dean 2000). Lipaz, pankreastan salgılanan ve yaklaşık 42 Kilodalton (kDa) moleküler ağırlığında trigliseridleri 1. ve 3. pozisyonlarında hidrolize ederek geride monogliserid bırakan pankreatik hastalıkların tanısında kullanılan bir sindirim enzimidir. Pankreas dokusunda meydana gelen türlü zedelenme serum lipaz aktivitesinde yükselmeye sebep olmaktadır (González 2006).

Kanatlılarda, pankreas fonksiyonunun değerlendirilmesinde serum amilaz ve lipaz konsantrasyonları

ölçülmektedir. Bu parametrelerdeki meydana gelen artış, pankreas veya böbrek hasarı ile ilişkili değerlendirilmektedir (ICSH 1978; Isolauri ve ark. 2001). Serum demir düzeyi, hemoglobin (Hb) sentezi için gerekli demiri miktarının belirlenmesinde, TIBC ise anemilerin ve demir metabolizmasının değerlendirilmesinde, UBİC ve % SAT parametreleri ise doymamış demir bağlama kapasitesinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Serumda % SAT düzeyi, serum transferrin konsantrasyonunun doğrudan göstergesi olan toplam demir bağlama kapasitesiyle (TIBC) ters orantı göstermektedir (Kefalı ve Toker 2006). Biyokimyasal parametrelerin değişmesine yol açan stresin kanatlılarda olası zararlı etkilerinin azaltılabilmesine yönelik araştırmalar durduraksız devam etmektedir. Kanatlılarda stres sonucu meydana gelen ölüm ve enfeksiyonların azaltılması, verimliliğin arttırılmasında başta bazı antimikrobiyal, antioksidan etkilere sahip bitki ekstraktı, probiyotikler, prebiyotiklerin kullanılması önemli uygulamalar içerisinde yer almaktadır (Klasing 1998; Khan ve ark. 2002; Botsoglou ve ark. 2004). Gerçekleştirilen bu deneysel çalışma, sıcaklık stresi ile indüklenen broylerde serumda P, lipaz, Na, Cl, P, UBİC, TIBC, % SAT düzeylerinin karşılaştırılmasının yanında eş zamanlı olarak içme sularına ilave edilen stresin olumsuz etkilerinin azaltılmasına yardımcı olan antioksidan özelliklere sahip EOM serumda P, lipaz, Na, Cl, UBİC, TIBC, % SAT düzeyleri üzerindeki etkisinin incelemesi amacıyla yapılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Hayvan Materyali

Araştırma için hayvan materyali olarak 400 adet bir günlük yaştaki Ross-308 etlik civciv kullanıldı. Çalışma, alıştırma (7 gün) ve besi (35 gün) dönemlerini kapsayacak şekilde toplam 42 gün sürdü. Her grupta 50 hayvan olacak şekilde 8 farklı gruba ayrıldı. Her grupta kendi içerisinde her bölmede 10 adet hayvan olacak şekilde 23°C stressiz grup ve 36°C stres uygulanacak şekilde Kontrol (K), K+250 ml/l, K+500ml/L, K+750ml/L olacak 5 alt gruba ayrıldı. Çalışma etik kurul onayını takiben (Karar tarihi ve sayısı: 22.02.2018-2/24), Bayburt Üniversitesi Gıda, Tarım ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Birimine bağlı kanatlı ünitesinde, hayvan refahı ve hakları korunarak etik ilke ve kurallarına riayet edilerek gerçekleştirildi. Araştırma süresince

broiler civcivlerin önünde sürekli olarak günlük ve taze su bulunduruldu. Deneme kümesinin genel ısısı ilk 2 gün 32-33°C ve daha sonraki 5 günde 27-28°C'de sabit tutulmuş daha sonra kademeli olarak artırılarak sıcaklık stresi uygulandığı dönemde sıcaklık 36°C'de nem ise % 75-85, ısı stresi uygulanmayan gruplar ise 22°C'de sıcaklık sabit tutulmuştur. Deneme boyunca 24 saat aydınlık (60 W)

olacak şekilde uygulandı. Tüm gruplara tablo 1'de içeriği verilen bazal diyet yemleri verildi. İçme suları da her gün aynı saatte alınarak içlerine EOM ilave edilerek yeni suları hayvanlara verildi. Bu araştırma için kullanılan yemlerin analizi, A.O.A.C belirtilen yöntemlere uygun olarak gerçekleştirildi (AOAC 2005).

**Tablo 1:** Temel rasyonun kompozisyonu ve bileşimi (%)

Ham maddeler	Başlangıç yemi (0-14 gün)	Büyütme yemi (14-28 gün)	Bitiriş yemi (28-42 gün)
Mısır	52,70	54,60	58,12
Mısır Gluten Yemi	15,21	21,20	26,14
Soya Fasulyesi Küspesi	26,35	18,90	10,65
Di-kalsiyum Fosfat	1,95	1,70	1,60
Kalsiyum Karbonat	1,18	1,10	1,04
Sodyum Klorür	0,31	0,31	0,31
Sodyum Bikarbonat	0,20	0,20	0,20
Tuz	0,20	0,20	0,20
Metiyonin	0,50	0,50	0,44
Lizin	1,20	1,10	1,10
Vitamin- mineral premiks	0,20	0,20	0,20
ME (Kcal/ kg)	3100	3150	3225
Ham Protein %	24	22	20
Ham Yağ %	2,61	2,30	2,50
Nem %	13,20	13,20	13,20

EOM Karışımın İçeriği

EOM karışımına ait içerik Bayburt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarlarında GC (Gaz kromatografisi) (Agilent 5977B, GC/MSD, GERMANY) cihazı ile analiz ettirilmiştir (Özek ve ark. 2010). EOM içeriğinde %26,70 Durenol, %23,89 Öcenol, %16,49 Gamma terpinen, %8,35 Heptaetilen glikol, %6,42 Heksaetilen glikol, %3,31 simen, %3,08 Penetilen glikol, %2,87 Kariofilen, %2,30 D-Limonen, %2,18 Betapinen, %0,95 Ökaloitol bulunmuştur.

### Kan Örneklerinin Toplanması

Araştırma sonucunda, her grup içerisinde rastgele bir şekilde 10 ve toplamda 80 hayvan kesim sırasında akan kandan örnekler alındı. Kan numunelerinde serum elde edilmesi için soğutmalı santrifüjde (NF 1200R, NÜVE, Ankara, TÜRKİYE) 12 dakika santrifüj edildi.

### Serum P, lipaz, Na, Cl, % SAT, UBİC, TIBC Tayini

Serumda P düzeyi, Cobas-8000 otoanalizörde (Roche Diagnostics, Almanya) ölçümü gerçekleştirilmiştir. Serum transferrin doyumluk seviyeleri, aşağıdaki formülasyonla serum demir düzeyleri ve serum toplam demir bağlama kapasitesi seviyelerinden hesaplanarak belirlendi Voyvoda ve ark. (1992): Transferrin doyumluğu (%) = (Fe / TIBC) x 100

### İstatistiksel analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizinde IBM SPSS 20.0 programında stresin rasyonlara katılan ekstrakt, stres ve diyet\*stres faktörleri üzerine etkileri General Linear Model Univariate'de Duncan testi uygulanmıştır. Verilerin ortalamaları standart hatalarıyla ifade edilerek ( $\pm$ ) anlamlı farklılıklar

$p < 0,05$  düzeyinde test edilip değerlendirilerek incelenmiştir.

## Bulgular

Deneyel olarak sıcaklık stresi ile indüklenen broyler gruplarında içme suyuna ilave edilen EOM karışımına bağlı olarak bazı kan parametreleri üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla elde edilen veriler (Tablo 2) aşağıda tablo halinde verilmiştir. Tüm gruplarda uygulanan broyler gruplarında 22°C

gruplarda serumda UIBC ve TIBC parametreleri üzerine kontrol grubuna kıyasla EOM karışımı verilen gruplarda artış olurken en fazla artışın 500 ml/1000 L gruplarda görülmüştür. 36°C gruplarda ise UIBC, TIBC ve Cl parametreleri üzerine kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu en fazla azalmanın da 500 ml/1000 L gruplarda olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Diğer yandan her iki deney grubunda uygulanan EOM karışımı uygulaması neticesinde P, lipaz, % SAT, Na düzeyleri üzerine etkisi olmamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 2.** Sıcaklık stresi uygulanan deney gruplarında EOM uygulamasının bazı kan parametrelerine göre interaksyonu.

	UIBC		TIBC		SAT %		Lipaz		Na		Cl		P	
	22°C	36°C	22°C	36°C	22°C	36°C	22°C	36°C	22°C	36°C	22°C	36°C	22°C	36°C
Kontrol	0,00 <sup>b</sup>	22,40 <sup>a</sup>	88,20 <sup>b</sup>	110,40 <sup>a</sup>	7115,83	9686,87	0,00	0,00	148,20	147,60	114,00	116,80 <sup>a</sup>	5,92	5,68
EOM 250 ml/1000l	20,60 <sup>ab</sup>	17,80 <sup>ab</sup>	102,80 <sup>ab</sup>	96,00 <sup>ab</sup>	8508,20	7709,72	0,00	0,00	150,80	146,60	116,40	115,40 <sup>a</sup>	5,44	5,82
EOM 500 ml/1000l	25,20 <sup>a</sup>	3,80 <sup>c</sup>	128,60 <sup>a</sup>	79,80 <sup>b</sup>	11314,18	7480,85	0,00	0,00	150,00	137,40	115,20	104,00 <sup>b</sup>	5,76	6,66
EOM 750 ml/1000l	18,60 <sup>ab</sup>	9,00 <sup>bc</sup>	117,00 <sup>ab</sup>	94,00 <sup>ab</sup>	10844,31	12065,46	0,00	0,00	149,00	149,40	112,60	115,80 <sup>a</sup>	7,08	4,74
<b>Varyasyon kaynağı (P değerleri)</b>														
Diyet	0,52		0,86		0,41		0,00 0,00		0,30		0,07		0,82	
Sıcaklık	0,46		0,03		0,89		0,00 0,00		0,06		0,39		0,47	
Sıcaklık*Diyet	0,00		0,00		0,49		0,00 0,00		0,17		0,03		0,07	
<b>Diyetin başlıca etkisi</b>														
Kontrol	11,20±3,81		99,30±6,45		8401,35±1536,86		0,00 0,00		147,90±2,23		115,40±1,80 <sup>a</sup>		5,80±0,44	
EOM 250 ml/1000l	19,20±3,81		99,40±6,45		8108,96±1536,86		0,00 0,00		148,70±2,23		115,90±1,80 <sup>a</sup>		5,63±0,44	
EOM 500 ml/1000l	14,50±3,81		104,20±6,45		9397,52±1536,86		0,00 0,00		143,70±2,23		109,60±1,80 <sup>b</sup>		6,21±0,44	
EOM 750 ml/1000l	13,80±3,81		105,50±6,45		11454,88±1536,86		0,00 0,00		149,20±2,23		114,20±1,80 <sup>ab</sup>		5,91±0,44	
<b>Sıcaklık</b>														
22 °C	16,100		109,150		9445,636		0,00 0,00		149,500		114,550		6,050	
36 °C	13,250		95,050		9235,728		0,00 0,00		145,250		113,000		5,725	
SEM	2,70		4,56		1086,72		0,00 0,00		1,57		1,27		0,31	

## Tartışma ve Sonuç

Sıcaklık stresi, kanatlılarda K, Na, Ca gibi minerallerin atılımını artırarak, Mg ve dolayısıyla kuşların elektrolit dengesini bozmaktadır (McCormick ve ark. 1979; Molero 2007). Başta P, Ca, Na, Mg gibi elementlerin seviyelerinin azalmasına yol açmaktadır (Kohne ve Jones 1975; Klasing 1998). Ayrıca, akut sıcaklık stresine maruz kalarak aç bırakılmış

tavukların hayatta kalmasını etkileyen elementlerden birisi olan P ve Ca bu açıdan da kritik bir öneme sahip olduğu bildirilmektedir (Smith ve Teeter 1987; Savica ve ark. 2012).

Mevcut çalışmamız için gerçekleştirilen literatür taramasında sıcaklık stresine maruz kalan broyler içme suyuna farklı oranlarda EOM uygulamasının serumda P, lipaz, Na, Cl, UIBC, TIBC, % SAT



seviyelerinin nasıl değiştirdiğine yönelik çalışmalar kısıtlı sayıda bulunmaktadır. Ayrıca, mevcut çalışma sıcaklık stresi uygulanan etlik piliçlerde içme sularına farklı oranlarda katılan bitkisel ekstraktların bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisinin incelenbilmesine olanak sağlaması yönünden önemlilik arz etmektedir. Araştırma sonucunda EOM uygulamasına bağlı olarak serumda P, lipaz, UBİC, TIBC, Na, % SAT değerleri üzerinde etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler yapılan araştırma sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (Nelson, 1967; McCormick ve ark. 1980; Vahl ve ark. 1987; Lumeij 1997; Salvador ve ark. 1999; Borges ve ark. 2004; Khan ve ark. 2002; Daneshyar ve ark. 2009; Tekce ve Gül 2015). TIBC, transferrinin gerçek demir bağlama kapasitesini, demir emiliminin ve tahmini bilgi sağlayan önemli bir göstergedir (ICSH 1978; Daneshyar ve ark. 2009). İçme suyuna ilavesine kekik ekstraktı uygulandığı araştırmada serumda TIBC miktarı anlamlı bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Mevcut araştırmamızın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (Conway ve ark. 2006).

Sonuç olarak mevcut çalışmamızda EOM uygulamasına bağlı olarak serumda P, lipaz, UBİC, TIBC, Na, % SAT değerleri üzerinde etkisinin bulunmamasının nedeni araştırma sürecince ısı uygulamasına karşı vücudun termoregülasyon mekanizmalarında epigenetik adaptasyon kazanabilmiş olabileceği kanaatine varılmıştır. Mevcut çalışmaların kısıtlı sayıda olması nedeniyle daha kapsamlı araştırmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

### Teşekkür

Bu çalışma içerisinde yer alan lipaz parametresi, 25-27 Mayıs 2018 tarihlerinde 1.Uluslararası GAP Tarım ve Hayvancılık Kongresinde “Investigation of the Effect of Some Plant Extracts on Serum Lipase Used in Drinking Waters at Different Rates in Heat Stress Induced Broilers” başlıkla sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

### Kaynaklar

1. Abdulkarimi R, Daneshyar M. (2012) The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract supplementation in drinking water on iron metabolism in broiler chickens. *J Med Plant Res.* 6(5),645-650. DOI: 10.5897/JMPR11.090.

2. Al-Marzooqi W, Leeson S. (1999) Evaluation of dietary supplements of lipase, detergent, and crude porcine pancreas on fat utilization by young broiler chicks. *Poult Sci.* 78(11), 1561-1566. DOI:10.1093/ps/78.11.1561.
3. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). (2005) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Rockville, MD, USA.
4. Asimov I. (1974) *Asimov on Chemistry*. Doubleday: Garden City, NY, USA.
5. Borges SA, Fischer da Silva AV, Majorca A, Hooge DM, Cummings KR. (2004) Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram). *Poult Sci.* 83(9), 1551-1558. DOI: 10.1093/ps/83.9.1551.
6. Conway RE, Geissler CA, Hider RC, Thompson RP, Powell JJ. (2006) Serum iron curves can be used to estimate dietary iron bioavailability in humans. *Nutr J.* 136(7), 1910-1914. DOI: 10.1093/jn/136.7.1910.
7. Daneshyar M, Kermanshahi H, Golian A. (2009) Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. *Poult Sci.* 88, 106. DOI: 10.3382/ps.2008-00170.
8. Dorman HJD, Dean SG. (2000) Antimicrobial agent from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
9. González FHD. (2006) *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. 2aed. Porto Alegre: UFRGS, 360p.
10. International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). (1978) The measurement of total and unsaturated iron binding capacity in serum. *Br J Haematol.* 38, 281-290. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1978.tb01044.x.
11. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. (2001) Probiotics: Effects of immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73,444-450. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.444s
12. Kefalı S, Tokar NY. (2006) Effects of probiotics on some acute phase proteins in broilers exposed to *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides 1,2. *Arch. Geflügelk.* 10 (6), 270-277.
13. Khan WA, Khan A, Anjuman A, Rehman Z. (2002) Effects of induced heat stress on some biochemical values in broiler chicks. *Int J Agric Biol.* 4, 74-5.
14. Klasing KC. (1998) *Comparative Avian Nutrition*; CAB International: Wallingford, UK.
15. Kohne HJ, Jones JE. (1975) Changes in plasma electrolytes, acid-base balance and other physiological parameters of adult female turkeys under conditions of acute hyperthermia. *Poult Sci.* 54, pp. 2034-2038. DOI: 10.3382/ps.0542034
16. Lumeij JT. (1997) *Avian clinical biochemistry*. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th edn. Academic Press, London, pp 857-883.
17. McCormick CC, Garlich JD, Edens FW. (1979) Fasting and diet affect the tolerance of young chickens exposed

- to heat stress. *J. Nutr.* 109 , pp. 1797-1809. DOI: 10.1093/jn/109.10.1797.
18. McCormick CC, Garlich JD, Edens FW. (1980) Phosphorus nutrition and fasting: interrelated factors which affect the survival of young chickens exposed to high ambient temperature. *J. Nutr.* 110 , pp. 837-850. DOI: 10.1093/jn/110.4.784.
  19. Molero C. (2007) Nutritional solutions to heat stress. *International Poultry Production*. Volume 15, number 5, 27- 29.
  20. Moraesa VMB, Malheirosb RD, Bruggemanb V, Collinc A, Tonab K, Van Asb P, Onagbesanb OM, Buyseb J, Decuyper E, Macaria M. (2003) Effect of Thermal Conditioning During Embryonic Development on Aspects of Physiological Responses of Broilers to Heat Stres. *J of Thermal Biol.* 28(2),133-140.DOI: 10.1016/S0306-4565(02)00049-9.
  21. Nelson TS. (1967) The Utilization of Phytate P by Poultry a review. *Poult Sci.* 46: 862. DOI: 10.3382/ps.0460862.
  22. NRC. (1984) *Nutrient Requirements of Poultry*. 8th Rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
  23. Salvador D, Arıki J, Borges SA, Pedroso AA, Moraes VMB. (1999) Suplementação de bicarbonato de sódio na ração e na água de bebida de frangos de corte submetidos ao estresse calórico. *ARS Veterinária.* 15,144-148.
  24. Savica V, Calo LA, Monardo P, Santoro D, Bellinghieri G. (2012) Phosphate binders and management of hyperphosphataemia in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 21(8),2065-2068.DOI: 10.1093/ndt/gfl289.
  25. Smith MO, Teeter RG. (1987) Potassium balance of the 5 to 8-week-old broiler exposed to constant heat or cycling high temperature stress and the effects of supplemental potassium chloride on body weight gain and feed efficiency. *Poult Sci.* 66(3), 487-492. DOI: 10.3382/ps.0660487.
  26. Tekce E, Gül M. (2015) Sıcaklık Stresi Altında Beslenen Etçi Piliçlerde Origanum Syriacum Uçucu Yağının performans Antioksidan Potansiyel Lipid Profili Bağırsak Mikroflorası ve Et Kalitesine Etkisi. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
  27. Vahl HA, Van T, Klooster AT. (1987) Dietary iron and broiler performance. *Br Poult Sci.* 28(4),567-576.DOI: 10.1080/00071668708416992.
  28. Voyvoda H, Sekin S, Bildik A. (1992) Koyunlarda Dexamethason Uygulmasının Serum Demir, Total Demir Bağlama Kapasitesi, Transferrin Doyumu ve Bakır Düzeyine Etkisi. *YYU Vet Fak Derg.* 3(1), 197-208.
  29. Botsoglou NA, Christaki E, Florou-Paneri P, Giannenas I, Papageorgiou G, Spais AB. (2004) The effect of a mixture of herbal essential oils or  $\alpha$ -tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *S Afr J Anim Sci.* 34(1), 52-61.DOI: 10.4314/sajas.v34i1.4039.
  30. Özek G, Demirci F, Özek T, Tabanca N, Wedge DE, Khan SI, Başer KHC, Duran A, Hamzaoglu E. (2010) Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. *J Chromatogr A.* 1217,741-748. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.086.

# Tavuk Dışkılarını ve Çevresel Örneklerden *Salmonella* Infantis Fajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Ebru Torun<sup>1</sup>, Hamit Kaan Müştak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.10.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 09.12.2019

**Özet:** Bu çalışmada, Türkiye’de en çok izole edilen kanatlı *Salmonella* serotipi olan *S. Infantis* bakteriyofajlarının izolasyonu ve bu fajların konak spektrumunun belirlenmesi ayrıca bu fajların su, yem ve altlık materyallerindeki etki ve yaşam süreleri ile saklama sürelerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, 50 adet dışkı-altlık ve 50 adet atık su örneğinden izole edilen 38 adet *S. Infantis* fajının, rutin test dilüsyonları, litik spektrumları ve litik profilleri belirlenerek seçilen fajlar RAPD-PCR ile genotiplendirildi. Litik profilleri ve RAPD homoloji düzeyleri birbirinden farklı olanlar arasından seçilen en yüksek litik spektruma sahip fajların (SF-In7, SF-In20) faj-bakteri dinamikleri incelendi. SF-In7, SF-In20 fajlarının adsorbsiyon oranı 20 dk’da %95 ve latent dönemleri ise sırasıyla 57 dk ve 65 dk olarak belirlendi. Deneysel çalışmalarda SF-In7 ve SF-In20 fajlarının 24 saatte canlı *S. Infantis* sayısını su materyalinde 4 log<sub>10</sub> cfu/ml (p<0,001), altlık ve yem materyalinde 2-3 log<sub>10</sub> cfu/ml (p<0,001) azalttığı, konak hücre bulundurmayan su materyalinde 4 hafta, altlık ve yem materyallerinde ise 3 hafta yaşadığı tespit edildi. Ayrıca çalışmada, SF-In7 ve SF-In20 fajlarının oda ısısında (20-22°C) 6 hafta, 4°C’de 9 ay, -20°C ve -80°C’de ise 4 yıldan fazla canlılıklarını korudukları belirlendi. Çalışma sonucunda, SF-In7 ve SF-In20 fajlarının *S. Infantis* kontaminasyonunu azaltmada biyokontrol ajanı olarak kullanılabilceği, geniş saklama ısısı ve uzun yaşam süresi sebebiyle saha, kümes, kesimhane gibi ortamlarda uygulanmadan önce uzun süre kolaylıkla saklanabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyofaj, biyokontrol, tavuk, *Salmonella* Infantis.

## Isolation and Characterization of *Salmonella* Infantis Phages from Poultry Faces and Environmental Samples

**Abstract:** In this study, it was aimed to isolate the bacteriophages of *S. Infantis*, the most isolated *Salmonella* serotype of poultry in Turkey, to determine the effect and lifespan in the water, litter and feed and to detect the host spectrum and the storage time of these phages. In this study, the routine test dilutions, lytic spectra and lytic profiles of 38 *S. Infantis* phages isolated from 50 stool-litter and 50 wastewater samples were determined and the selected phages were genotyped by RAPD-PCR. Phage-bacterial dynamics of phages with the highest litic spectrum (SF-In7, SF-In20) selected among the different litic profiles and RAPD homology levels were investigated. The adsorption rate of SF-In7, SF-In20 phages was determined as 95% in 20 min and latency periods were determined as 57 min and 65 min, respectively. In experimental studies, it was determined that the SF-In7 and SF-In20 phages decreased the number of alive *S. Infantis* in 24 h at 4 log<sub>10</sub> cfu/ml (p<0.001) in water and at 2-3 log<sub>10</sub> cfu/ml (p<0.001) in feed and litter and found to be alive for 4 weeks in the water and 3 weeks in the feed and litter without host cells. In addition, it was also determined that the SF-In7 and SF-In20 phages survived for 6 weeks at room temperature (20-22°C), 9 months at 4°C, and more than 4 years at -20°C and -80°C. As a result of the study, SF-In7 and SF-In20 phages can be used as biocontrol agents to reduce the *S. Infantis* contamination, and can be stored easily for a longtime period before application in environments such as field, poultry house, slaughterhouse due to its large storage temperature and long life span.

**Key words:** Bacteriophage, biocontrol, chicken, *Salmonella* Infantis.

## Giriş

*Salmonella* enfeksiyonları tüm dünyada ve Türkiye’de kanatlı endüstrisinin en önemli problemlerinden birisidir (Aksakal, 2003). Ayrıca kanatlı hayvanlardan insanlara gıda kaynaklı bulaşarak zoonotik enfeksiyonlara neden olması sebebiyle halk sağlığı açısından da oldukça önemlidir (Sengül ve

Türkyılmaz, 2007; EFSA 2016). *Salmonella* genusu içerisinde yer alan yaklaşık 2700 serotip içerisinde insanlarda Salmonellozise neden olan en yaygın serotipler *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* olarak bilinmektedir. Ancak son yıllarda başta *S. Infantis* olmak üzere diğer serotiplerin izolasyon oranlarının arttığı gözlenmektedir (Miller ve ark. 2010). European Food Safety Authority (EFSA)’nın son

raporunda (EFSA, 2017), *S. Infantis*'in insanlarda en yaygın dördüncü serotip olduğu, bununla beraber son beş yılda tavuklarda en yaygın görülen serotipin *S. Infantis* (%33,6) olduğu ve bunu *S. Enteritidis* (%15,8) ve *S. Mbandaka* (%6,7)'nin izlediği bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise tavuklardan izole edilen en yaygın serotipin *S. Infantis* olduğu belirlenmiştir (Anonim 2018).

Bakteriyofajların insanlarda tedavi amacıyla kullanımı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Özellikle *Salmonella*'larda antibiyotiklere karşı gelişen dirençle beraber kanatlı Salmonellozis'inin önlenmesi ve tedavi edilmesi için de alternatif olarak faj çalışmaları bulunmaktadır. *Salmonella* fajları, kanatlı dışkıları ve kanatlı çiftlikleri çevresinden kolaylıkla izole edilebilmekte ve kanatlı üretiminden başlayarak kümes uygulamaları (yem, altlık, su, yüzey gibi materyaller), hayvanlarda kolonizasyonu önlemek veya azaltmak için hayvan uygulamaları, ya da gıda uygulamalarında kullanılabilir. *Salmonella* fajları ile *Salmonella* kolonizasyonunun tavuklarda azaltılması (Atterbury ve ark. 2007; Borie ve ark. 2008; Bardina ve ark. 2012) üzerine ve insanlara *Salmonella* geçişini azaltmak amacıyla gıda maddelerinde ve gıda hazırlama bölgelerinde *Salmonella* kontaminasyonunun önlenmesi ve azaltılması üzerine birçok çalışma mevcuttur (Spricigo ve ark. 2013; Woolston ve ark. 2013; Huang ve ark. 2018). Bu çalışmalar genellikle en yaygın serotipler olan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serotipleri kullanılarak yapılmıştır. Ancak çalışmalarda *S. Infantis* serotipi kullanılarak faj izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapıldığı bulaşma kaynağı olan su, altlık ve yem materyallerinde *in vitro* olarak *S. Infantis* fajlarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'de en çok izole edilen kanatlı *Salmonella* serotipi olan *S. Infantis*'in bakteriyofajlarının izolasyonu ve bu fajların konak spektrumlarının belirlenmesi, ayrıca izolasyonu yapılan ve konak aralığı belirlenen bu fajların etki, yaşam ve saklama sürelerinin saptanması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

### Bakteri Suşları ve Kontrol Fajı

*Salmonella Infantis* suşları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

kültür koleksiyonundan temin edildi. Konak hücreleri olarak lizojenik faj bulundurmadığı bilinen kanatlı orijinli 10 adet *S. Infantis* suşu, fajların litik spektrumlarını belirlemek amacıyla ise kanatlı orijinli 200 adet *S. Infantis* suşu kullanıldı. Kontrol amacıyla çalışmanın tüm aşamalarında Gürcistan ELIAVA Enstitüsü'nden temin edilen *S. Enteritidis* vB-GES-Se-K1 Tiflis Fajı kullanıldı.

### Bakteriyofaj İzolasyon Materyali

İzolasyon için, Ankara ve Bolu illerinde yer alan kanatlı işletmelerinden toplanan 50 adet dışkı-altlık örneği ve kanatlı kesimhanelerine ait arıtma tesislerinden toplanan 50 adet atık su örneği olmak üzere toplam 100 örnek kullanıldı.

### Bakteriyofajların İzolasyonu ve Çoğaltılması

Tavuk dışkı-altlık örnekleri 1/10 oranında Luria Bertani broth (Neogen, USA) ile sulandırılıp homojenize edilerek, atık sular ise direkt olarak santrifüj edildikten sonra 0,2 µm'lik filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirildi, filtratlar ayrıldı ve faj kaynağı olarak kullanıldı. Filtratlar 10 ml çift katlı LB broth içerisine besi yeri ile eşit miktarda alındı ve *S. Infantis* suşunun 4-6 saatlik logaritmik fazdaki kültüründen 500 µl eklenerek 37°C'de 50 rpm'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda 7000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant 0.2 µm filtreden geçirildi. Filtratlardaki litik aktivitenin belirlenmesi amacıyla spot test uygulandı. Kullanılan *S. Infantis* suşunun logaritmik fazdaki sıvı kültüründen dip katı agara (LB Broth 20 g/L, Bakteriyolojik Agar 15 g/L) 100 µl yayma ekim metodu ile ekildi ve üzerine 10 µl faj filtratı damlatılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Litik faj aktivitesi görülmeyen filtratlar atıldı, görülen filtratlar ise agar-overlay yöntemi ile saflaştırıldı (Carey-Smith ve ark. 2006; Kutter, 2009; Bao ve ark. 2011). Saflaştırılan fajlar agarın üzerine dökülen SM (Saline-Magnesium, faj tamponu: 5,8 g/L NaCl, 2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 ml/L 1 M Tris-HCl, 5 ml/L %2'lik Jelatin solüsyonu) solüsyonu ile bir gece 37°C'de 50 rpm'de inkübe edildikten sonra toplandı. Toplanan süspansiyon 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek, üst sıvı 0.2 µm filtreden geçirildi. Elde edilen fajlar içerisine 1-2 damla kloroform eklenerek -80°C'de saklandı.



### Rutin Test Dilüsyonunun Belirlenmesi

Rutin Test Dilüsyonu (RTD)'nu belirlemek için agar-overlay yöntemi kullanıldı. Bu amaçla  $10^6$  cfu/ml *S. Infantis* suşunun ekildiği agar üzerine her bir faj stoğunun ayrı ayrı LB broth ile hazırlanan  $10^{-1}$ - $10^{-12}$  arasında 10 katlı dilüsyonlarından ayrı ayrı işaretlenen yere 10 µl damlatıldı.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında plak formasyonları okundu ve stok faj süspansiyonundaki faj sayısı mililitredeki plak oluşturan ünite (pfu/ml) cinsinden hesaplandı (Kropinski ve ark. 2009).

### Fajların Litik Spektrumlarının ve Litik Profillerinin Belirlenmesi

Elde edilen *S. Infantis* fajlarından, RTD  $1 \times 10^4$ 'ün üzerinde olanların her birinin 200 adet *S. Infantis* suşundaki litik spektrumları spot test yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla, logaritmik fazdaki *S. Infantis* suşları 100 µl dip agar üzerine yayma ekim yöntemi ile ekildi. Rutin test dilüsyonu  $10^4$ - $10^9$  pfu/ml olan fajlar, işaretlenmiş yerlere 10 µl damlatıldı ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda faj plaklarının oluşup oluşmamasına göre fajların litik spektrumu değerlendirildi (Carey-Smith ve ark. 2006; Kutter, 2009; Bao ve ark. 2011). Fajların litik profillerinin belirlenmesi amacıyla ise ilk önce suşlar numaralandırıldı ve her bir fajın hangi *S. Infantis* suşunu lize ettiği kaydedildi. Aynı suşları lize eden fajlar benzer litik profilde kabul edildi. Litik profilleri en fazla lize edilen suş sayısına göre numaralandırıldı (Cortes ve ark. 2015).

### Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR Analizi

Farklı litik profile sahip fajlar arasında, %90 ve üstü litik spektruma sahip fajların tamamının faj DNA izolasyonu, Norgen Faj DNA İzolasyon Kiti (Norgen Biotek, Kanada) ile kitin protokolüne göre gerçekleştirildi. Polimorfik DNA'nın rastgele çoğaltılması için RAPD PCR analizi Cortes ve ark. (2015) ile Gutierrez ve ark. (2011)'nin bildirdikleri yöntem göre gerçekleştirildi. Amplifikasyon amacıyla Cortes ve ark. (2015) ile Gutierrez ve ark. (2011)'nin çalışmalarında önerdikleri ve en fazla RAPD paternini oluşturan P1 (5'-CCGCAGCCAA-3') primeri kullanıldı.

### Faj-Bakteri Dinamikleri

İzolasyonu yapılan fajlardan, RTD  $10^{-4}$ 'ün üzerinde olup, %90 ve üstü litik spektruma sahip, litik profilleri ve RAPD PCR paternleri birbirinden farklı olan fajlar ve bu fajların konak *S. Infantis* suşu seçilerek bütün faj-bakteri dinamiklerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı. Minimal faj ve minimal bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla Wiggins ve Alexander (1985)'in yöntemi; faj adsorbsiyon oranının belirlenmesi için ise Sanders ve Klaenhammer (1980)'in bildirdiği yöntem kullanıldı. Faj adsorbsiyon oranı zamana karşı pfu'daki azalma oranı olarak ifade edildi. Hyman ve Abedon (2009)'un bildirdiği yöntem göre faj latent süreleri 0, 30, 45 ve 45 dk sonra birer dakikalık periyotlarda agar overlay yöntemi ile faj sayımı yapılarak kontrol edildi.

### Faj Etkinliğinin Saptanması

Bu aşamaya kadar bütün özellikleri araştırılan fajın etkinliği kendi konağı olan *S. Infantis* suşu kullanılarak su, altlık ve yem materyallerinde test edildi. Bu amaçla, *Salmonella* spp. yönünden negatif ve laboratuvar koşullarında  $10^6$  cfu/ml yoğunluktaki *S. Infantis* ile deneysel olarak inoküle edilmiş 9 ml su, 10 g altlık ve 10 g yem materyali her bir faj ve her saat için ayrı ayrı kullanıldı. Bu materyallere  $10^9$  pfu/ml yoğunluktaki fajdan 1 ml uygulanarak canlı bakteri sayısı üzerindeki etkisi ve etki süresi (1 h, 12 h ve 24 h) agar overlay yöntemi ile incelendi.

### Faj Yaşam Süresinin Saptanması

Bu amaçla, *Salmonella* spp. yönünden negatif olduğu belirlenen 9 ml su, 10 g altlık ve 10 g yem materyali her bir faj örneği ve her saat için ayrı ayrı kullanıldı. Bu materyallere  $10^9$  pfu/ml yoğunluktaki fajdan 1 ml uygulanarak yaşam süresi incelendi. Uygulama yapılan materyallerden bir hafta süreyle, her gün ve her hafta örnekler alınarak faj aktivitesinin korunup korunmadığı ve pfu sayısı agar-overlay yöntemi ile incelendi.

### Faj Saklama Süresinin Saptanması

Bu amaçla, RTD'nu  $1 \times 10^9$  olan fajlar arasından seçilen fajlar SM solüsyonuna toplandıktan sonra ikişer ml tüplere alındı. Tüpler oda ısısı,  $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Bu preparatlardan gittikçe artan zaman aralılarında (ilk hafta her gün, ilk ay



her hafta ve daha sonra aylık ve yıllık aralıklarla) örnekler alınarak faj aktivitesi ve sayısı agar-overlay yöntemi ile incelendi.

### İstatistiksel Analiz

Fajların etkinliği, 24 saat sonunda, faj uygulaması yapılmayan su, altlık ve yem örneklerindeki canlı *S. Infantis* sayısının, fajlar ile muamele edilmiş su, altlık ve yem örneklerindeki canlı *S. Infantis* sayısı ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek için Ki-Kare analizi kullanıldı,  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi (Field, 2009).

### Bulgular

#### Bakteriyofaj İzolasyonu Bulguları

Toplanan 50 adet dışkı-altlık örneğinin 26 tanesinde faj aktivitesi belirlenirken sadece 18 adet faj saf olarak izole edildi. Toplanan 50 adet atık su örneğinin 29 tanesinde faj aktivitesi belirlendi ve 20 adet faj saf olarak izole edildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Kaynağına göre izole edilen toplam faj sayısı.

	Örnek sayısı	Faj Aktivitesi Spot test (%)	Faj İzolasyonu Agar-Overlay (%)
Altılık-Dışkı	50	26 (52)	18 (36)
Atık Su	50	29 (58)	20 (40)
Toplam	100	55 (55)	38 (38)

#### Rutin Test Dilüsyonu Bulguları

Toplam 38 fajdan 17 fajın RTD'ü  $10^4$ 'ün altında bulundu. Pasaj yapılarak konsantrasyonları arttırılmayan bu 17 adet faj daha sonraki aşamalarda kullanılmadı. RTD değeri  $10^5$  ve üstünde bulunan 21 fajın RTD değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

#### Fajların Litik Spektrumları ve Litik Profilleri

RTD  $1 \times 10^4$ 'ün üzerinde olan 21 fajın 17 farklı litik profile sahip olduğu, litik spektrumlarına göre ise SF-In22 fajının en dar (%69.5), SF-In7 fajının ise en geniş (%94.5) spektruma sahip olduğu belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 2.** 21 adet *S. Infantis* fajının kaynak, RTD, litik spektrumu ve litik profil verileri.

Faj	Kaynak	RTD	Litik Profil	Litik Etki Görülen Suş Sayısı (%)
SF-In1	Dışkı-altlık	$3 \times 10^8$	8	177 (88.5)
SF-In3	Atık Su	$2 \times 10^9$	13	169 (84.5)
SF-In4	Dışkı-altlık	$3 \times 10^9$	15	153 (76.5)
SF-In7	Dışkı-altlık	$2 \times 10^9$	1	189 (94.5)
SF-In8	Dışkı-altlık	$4 \times 10^5$	7	178 (89.0)
SF-In10	Dışkı-altlık	$3 \times 10^5$	12	172 (86.0)
SF-In12	Atık Su	$2 \times 10^9$	10	175 (87.5)
SF-In16	Atık Su	$2 \times 10^7$	14	167 (83.5)
SF-In18	Dışkı-altlık	$3 \times 10^5$	5	182 (91.0)
SF-In20	Atık Su	$2 \times 10^9$	2	188 (94.0)
SF-In21	Atık Su	$4 \times 10^7$	9	176 (88.0)
SF-In22	Atık Su	$2 \times 10^6$	17	139 (69.5)
SF-In24	Atık Su	$3 \times 10^5$	10	175 (87.5)
SF-In26	Atık Su	$3 \times 10^8$	11	172 (86.0)
SF-In27	Atık Su	$2 \times 10^5$	16	149 (74.5)
SF-In28	Dışkı-altlık	$3 \times 10^8$	12	172 (86.0)
SF-In31	Dışkı-altlık	$2 \times 10^6$	6	179 (89.5)
SF-In33	Dışkı-altlık	$3 \times 10^9$	7	178 (89.0)
SF-In35	Atık Su	$3 \times 10^9$	4	184 (92.0)
SF-In37	Atık Su	$2 \times 10^7$	3	186 (93.0)
SF-In38	Atık Su	$2 \times 10^7$	11	172 (86.0)

#### RAPD-PCR Analizi Bulguları

Litik profilleri farklı fajlar içinden litik spektrumları geniş ( $\geq 90\%$ ) olduğu belirlenen toplamda 5 adet *S. Infantis* fajı (SF-In7, SF-In18, SF-In20, SF-In35, SF-In37) RAPD-PCR ile moleküler tiplendirme amacıyla seçildi. RAPD-PCR sonucu en az bir polimorfik bant görülmesi ile fajlar farklı olarak değerlendirildi. RAPD-PCR sonucunda SF-In35, SF-In37 fajlarının benzer paterne sahip olduğu, SF-In7, SF-In18, SF-In20 fajlarının ise birbirinden ve SF-In35, SF-In37 fajlarından farklı olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre 5 adet *S. Infantis* fajı arasından, homoloji düzeyleri birbirinden farklı olup en yüksek litik spektruma sahip olan SF-In7 (%94.5), SF-In20 (%94.0) fajları, faj-bakteri dinamikleri ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi.

### Faj-Bakteri Dinamikleri Bulguları

Faj enfeksiyonu için gerekli minimal *S. Infantis* ve minimal faj sayıları sırasıyla SF-In7 için  $8.2 \times 10^4$  cfu/ml ve  $5.8 \times 10^4$  pfu/ml; SF-In20 için ise  $7.4 \times 10^4$  cfu/ml ve  $6.6 \times 10^4$  pfu/ml olarak belirlendi. Bununla birlikte, SF-In7 fajlarının %96'sının, SF-In20 fajlarının ise %95'nin 20 dk içerisinde konak hücrelerine adsorbe olduğu tespit edildi. Konak *S. Infantis* suşu için SF-In7'nin latent süresinin 57 dk, SF-In20'nin latent süresinin ise 65 dk olduğu belirlendi.

### Faj Etkinliğinin Saptanması Bulguları

Test edilen her iki faj için su, altlık ve yem materyallerinde ilk saat canlı bakteri sayısında herhangi bir değişim görülmedi. Tüm materyallerde canlı bakteri sayısındaki logaritmik azalma, 12 ve 24'üncü saatler için Tablo 3'de gösterildi. Her üç materyal için de 24'üncü saatte belirlenen logaritmik azalma anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 3.** Test edilen fajların 12 ve 24'üncü saatlerde neden oldukları canlı bakteri sayısındaki logaritmik ( $\log_{10}$ ) azalma (cfu/ml).

Faj	Su materyali		Altlık materyali		Yem materyali	
	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat	12 saat	24 saat
Kontrol	P*	P	P	P	P	P
SF-In7	3 $\log_{10}$	4 $\log_{10}$	1 $\log_{10}$	2 $\log_{10}$	2 $\log_{10}$	3 $\log_{10}$
SF-In20				3 $\log_{10}$		

\*P, canlı hücre sayısında azalma görülmedi.

### Fajların Yaşam Süresinin Saptanması Bulguları

Günlük ölçümlerin yapıldığı bir hafta içinde su, altlık ve yem materyallerinde SF-In7 ve SF-In20 fajları, titrelelerindeki azalmaya rağmen infektivitelerini devam ettirdikleri tespit edildi. Test edilen tüm materyallerde bir hafta içerisindeki faj titrelelerindeki logaritmik azalma ve yaşam süreleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Fajların titrelelerindeki logaritmik ( $\log_{10}$ ) azalma (pfu/ml) ve yaşam süreleri.

Faj	Su materyali		Altlık materyali		Yem materyali	
	1'nci hafta	Yaşam süresi	1'nci hafta	Yaşam süresi	1'nci hafta	Yaşam süresi
SF-In7	2 $\log_{10}$	4 Hafta	3.5 $\log_{10}$	3 Hafta	3.5 $\log_{10}$	3 Hafta
SF-In20						

### Fajların Saklama Süresinin Saptanması Bulguları

Ölçümler 2014-2018 yılları arasında yapıldı. Her iki fajın da artan zaman aralıklarında yapılan ölçümlere göre, oda ısısı (20-22°C), +4°C, -20°C ve -80°C'deki titrelelerinin değişmeden kaldığı süreler ve toplam yaşam süreleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Fajların farklı ısılardaki yaşam süreleri ve titrelelerinin değişmeden kaldığı süre.

Faj	Oda ısısı		+4°C		-20°C		-80°C	
	T	YS	T	YS	T	YS	T	YS
SF-In7	2 hafta	6 hafta	2 ay	9 ay	10 ay	>4 yıl	12 ay	>4 yıl
SF-In20								

\*T, faj titrelelerinin değişmeden kaldığı süre; YS, yaşam süresi.

### Tartışma ve Sonuç

*Salmonella* fajlarının izolasyonunda, dışkı-altlık materyalleri ve kanalizasyon suyu en sık kullanılan materyallerdir (Akhtar ve ark. 2014; Huang ve ark. 2018). Bu sebeple bu çalışmada, dışkı-altlık ve atık su örnekleri faj izolasyon materyali olarak belirlendi. Çeşitli çalışmalarda, kullanılan materyallerden *Salmonella* faj izolasyon oranları incelendiğinde farklı veriler mevcuttur. Bardina ve ark. (2012)'nin *S. Typhimurium*'u konak hücre olarak kullandıkları çalışmada toplam 189 dışkı örneğinden 55 adet *Salmonella* fajı (%29,1), Borrie ve ark. (2008), *S. Enteritidis*'i konak hücre olarak kullandıkları çalışmalarında ise 57 adet atık su materyalinden toplam 8 litik *Salmonella* (%14,03) fajı izole edilmiştir. *Salmonella Infantis*'in konak hücre olarak kullanıldığı bu çalışmada ise incelenen 50 atık su ve 50 altlık-dışkı materyalinden toplam 38 adet *S. Infantis* (%38) fajı saf olarak izole edildi. İzolasyon oranları karşılaştırıldığında bu oran Bardina ve ark. (2012) ve Borrie ve ark. (2008)'nin çalışmalarından farklı olarak daha yüksektir. Bu farklılığın, çalışmalarda kullanılan konak hücre serotipinden kaynaklandığı, *S. Infantis*'in bu çalışmada konak olarak seçilmesinin, faj izolasyon şansını ve oranını artırdığı düşünüldü.

Birçok çalışmada izolasyonu yapılan fajların litik spektrumları belirlenmiş ve kullanılacak fajlar en geniş spektruma sahip olmasına göre seçilmiştir (Atterbury ve ark. 2007; Bao ve ark. 2011; Huang

ve ark. 2018). Bu çalışmada, RTD  $1 \times 10^4$ 'ün üzerinde olan 21 *S. Infantis* fajının her birinin 200 adet *S. Infantis*, suşundaki litik spektrumları belirlenerek en geniş spektruma sahip ( $\geq 90$ ) fajlar seçildi. Bununla birlikte, seçim yapılırken fajların birbirinden farklı olmasını sağlamak için litik profiller de çıkarılmış ve litik profilleri birbirinden farklı fajlar seçilmiştir. Atterbury ve ark. (2007) da benzer olarak faj seçimi yaparken litik spektrumlara ek olarak litik profillere de bakmışlardır. Aynı çalışmada toplam 232 *Salmonella* fajı izole edilmiş ve farklı serotiplerden oluşan 70 *Salmonella* suşunda litik spektrum verileri değerlendirilerek 232 fajdan 80 farklı (%34,4) litik profil bulunmuştur. Cortes ve ark. (2015), 55 adet *Salmonella* fajının farklı serotiplerden oluşan 67 *Salmonella* suşunda litik spektrumlarını belirleyerek 39 (%70) farklı lizis profili elde etmiştir. Bu çalışmada ise litik spektrumuna bakılan 21 fajdan 17 farklı (%80) litik profil tespit edildi. Bu oran Atterbury ve ark. (2007) ile Cortes ve ark. (2015)'nin buldukları orandan fazladır. Çalışmada tek bir *Salmonella* serotipine (*S. Infantis*) ait fajların çalışılması ve fazla sayıda (200 adet) *S. Infantis* suşu üzerinde litik spektrum ve profil belirlenmesi faj çeşitliliğini arttırmıştır.

Moleküler yöntemlerden RAPD-PCR tekniği fajların genotipik olarak tiplendirilmesinde ucuz, kolay ve hızlı bir yöntem olması sebebiyle kullanılmaktadır (Gutierrez ve ark. 2011; Cortes ve ark. 2015). Bu sebeple, bu çalışmada da RAPD-PCR yöntemi, litik profilleri farklı fajlar içinden litik spektrumları geniş ( $\geq 90$ ) olduğu belirlenen toplamda 5 adet *S. Infantis* fajının (SF-In7, SF-In18, SF-In20, SF-In35, SF-In37) genotipik olarak tiplendirmesi amacıyla kullanıldı. RAPD-PCR yönteminde farklı primerler kullanılmış ve bu primerlerin ayırım güçleri karşılaştırılmıştır (Gutierrez ve ark. 2011; Cortes ve ark. 2015). Cortes ve ark. (2015) RAPD-PCR'da kullanılan 3 farklı primerden (P1, P2 ve OPL5), P1 primerinin 34 farklı PCR paterni ile en yüksek ayırım kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu sebeple bu çalışmada, yüksek ayırım kapasitesine sahip olmasından dolayı P1 primeri kullanıldı. Cortes ve ark. (2015), 55 adet *Salmonella* fajının RAPD-PCR'ı sonucu 40 farklı profil elde etmişler ve çıkardıkları litik profillerle kıyasladıklarında RAPD-PCR profilleri ile litik profillerin birbiri ile uyumlu olduğunu bildirmişler-

dir. Ancak bu çalışmada incelenen, litik profilleri farklı 5 *S. Infantis* fajından 4 farklı RAPD profili elde edildi ve iki fajın (SF-In35, SF-In37) tamamen benzer band sayısına sahip olduğu belirlendi. Fiorentin ve ark. (2004) litik profil ve RAPD band profili uyumsuzluğunun farklı primerler denenerek ortadan kalkabileceğini bildirdiğinden, bu durumun farklı primerler kullanıldığında ortadan kaldırılabilirliği düşünüldü.

Faj-bakteri dinamikleri denildiğinde, faj enfeksiyonu için gerekli minimum bakteri ve faj sayıları, fajın konağına adsorbe olma oranı, latent dönem süreleri gibi parametrelerin araştırılması gereklidir (Soykut ve Tunail 2009). Literatürde *S. Infantis* fajlarının faj parametreleri ile ilgili çalışmalara rastlanamamıştır, fakat farklı serotiplere ait *Salmonella* fajları ve farklı bakteri fajları üzerinde çalışmalar (Wiggins ve Alexander 1985) mevcuttur. Bu çalışmada, seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajları ve *S. Infantis* suşu ile yapılan çalışmalar sonucunda faj enfeksiyonu için gerekli minimal *S. Infantis* sayıları  $7,4 \times 10^4$ -  $8,2 \times 10^4$  cfu/ml ve minimal faj sayıları  $5,8 \times 10^4$ - $6,6 \times 10^5$  pfu/ml olarak belirlendi.

*Salmonella* serotiplerine ait fajların adsorbsiyon özelliklerini araştırarak yeterince çalışma bulunmamaktadır. Rahaman ve ark. (2014) kümes hayvanlarından izole edilen SAL-PG fajının %95'inin, 15 dk içinde konak bakterisi *S. Gallinarum*'a adsorbe olabildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise, seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının ortalama %95'inin 20 dk içinde konak hücreye adsorbe olduğu belirlendi. Bu sonucun, Rahaman ve ark. (2014)'nin belirlediği oranla birebir uyumlu olduğu fakat farklı olarak adsorbsiyon süresinin 20 dk olmasının, ölçümlerin 10 dk'da bir yapılmasından kaynaklandığı kanısına varıldı. Çalışmada seçilen iki fajın yüksek adsorbsiyon oranına sahip olması biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliğini düşündürdü. Yapılan çalışmalar incelendiğinde *Salmonella* fajları da dahil olmak üzere farklı bakteri fajları için farklı latent periyot süreleri mevcuttur (Wiggins ve Alexander 1985; Mirzaei ve Nilsson 2015). Mahmoud ve ark. (2018), 3 adet *Salmonella* fajının latent periyotlarını 35 dk, 40 dk ve 60 dk olarak belirtmiştir. Bu çalışmada ise seçilen SF-In7 ve SF-In20 fajlarının, konak *S. Infantis* suşu için latent sürelerinin sırasıyla 57 dk ve 65 dk olduğu belirlendi. Bu çalışmada test edilen fajların latent periyot süreleri diğer

(Wiggins ve Alexander 1985; Mirzaei ve Nilsson 2015) karşılaştırıldığında daha uzundur. Ancak bu çalışma sonuçlarının *Salmonella* fajları ile yapılan Mahmoud ve ark (2018)'nin çalışmasındaki latent periyod süreleri ile benzerlik göstermesi *Salmonella* fajlarının daha uzun latent periyod sürelerine sahip olabileceğini düşündürdü.

Literatürde *Salmonella* fajları ile, *Salmonella* kolonizasyonunun tavuklarda azaltılması (Atterbury ve ark. 2007; Borie ve ark. 2008; Bardina ve ark. 2012) üzerine ve insanlara *Salmonella* geçişini azaltmak amacıyla gıda maddelerinde *Salmonella* kontaminasyonunun önlenmesi ve azaltılması üzerine birçok çalışma mevcuttur (Spricigo ve ark. 2013; Thung ve ark. 2017; Duc ve ark. 2018). Ancak bulaşma kaynağı olan su, altlık ve yem materyallerinde *in-vitro* olarak *S. Infantis* fajlarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise parametreleri belirlenen geniş konak aralığı olan SF-In7 ve SF-In20 fajlarının, deneysel olarak *S. Infantis* inoküle edilen su, altlık ve yem numunelerinde *Salmonella* kontaminasyonunu azaltmadaki etkinlikleri literatürde ilk kez araştırıldı. Bu çalışmada seçilen iki fajın, 24 saatte, su materyalinde canlı bakteri sayısını yaklaşık olarak  $4 \log_{10}$  cfu/ml ( $p<0,001$ ), altlık materyalinde yaklaşık olarak  $2-3 \log_{10}$  cfu/ml ( $p<0,001$ ), yem materyalinde ise yaklaşık olarak  $3 \log_{10}$  cfu/ml ( $p<0,001$ ) azalttığı belirlendi. Tüm materyallerde ilk bir saatte sonuç alınmazken, bakteri sayısının azalmasında en iyi etkinlik ilk 12 saatte tespit edilmiş, ancak en iyi sonuçlar 24'üncü saatin sonunda belirlenmiştir. Faj etkinlik bulguları materyal açısından değerlendirildiğinde aynı koşullarda olmalarına rağmen (sabit bakteri sayısı, faj sayısı, sıcaklık, vb.) canlı *S. Infantis* sayısındaki en fazla azalmanın [ $4 \log_{10}$  cfu/ml ( $p<0,001$ )] su materyalinde gerçekleştiği görüldü. Bunun sebebinin, su materyalinin bakteriyofajların en çok izole edildiği doğal ortamı olması, diğer materyallere kıyasla suda inhibe edici birçok faktörün bulunmaması ve fajların sıvı ortamlarda konak hücre reseptörleri ile buluşmasının daha kolay olacağından, bakterileri infekte etme şanslarının fazla olması ile açıklanabileceği düşünüldü.

Literatürdeki birçok çalışma (Atterbury ve ark. 2007; Borie ve ark. 2008; Bardina ve ark. 2012; Duc ve ark. 2018; Huang ve ark., 2018) incelendiğinde fajlarla yapılan çalışmalarda alınan en temel

sonuç, serotip spesifik faj kullanılsa dahi 24 saat sonra ortamdaki *Salmonella*'ların tamamen giderilememesidir. Bu çalışmada da benzer olarak tüm materyallerde 24'üncü saatin sonunda, canlı bakteri sayısında yaklaşık  $2-4 \log_{10}$  cfu/ml ( $p<0,001$ ) azalma belirlenmesine rağmen *S. Infantis*'lerin tamamen giderilemediği belirlendi. Bunun en önemli nedeninin, faj-bakteri temasının ilerleyen saatlerinde faj direncinin gelişmesi olabileceği kanısına varıldı. Faj direnci önemli bir sorun teşkil etse de fajların tüm materyallerde bakterilerin sayısını önemli düzeyde azaltması, bakteri dekontaminasyonu için *S. Infantis* fajlarının kullanım potansiyelinin olduğu kanısına varıldı.

Fajların *in-vitro* yaşam süresini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır, fakat bu çalışmaların büyük çoğunluğu balık patojenlerinin fajları üzerinedir. Bu çalışmalarda (Nakai ve ark. 1999; Pereira ve ark. 2011; Madsen ve ark. 2013) farklı bakterilere ait fajlara ilişkin farklı yaşam süreleri mevcuttur. Bu açıdan bakıldığında fajların yaşam sürelerinin konak bakteriye, kullanılan faja ve içinde bulunduğu materyale göre değişiklik gösterdiği söylenebilir. Bu çalışmada, seçilen iki fajın konak hücre bulundurmeyen su, yem ve altlık materyallerinde yaşam süresi tespit edildi. Literatür taramalarında *S. Infantis* için su, altlık ve yem materyallerinde yapılan faj yaşam süresi çalışmalarına rastlanamamıştır. Bu sebeple bu çalışma bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışmada, fajların tüm materyallerde titrelerindeki azalmaya rağmen bir hafta süre canlı kaldığı tespit edildi. Bu bir hafta içerisinde titre bazında başlangıça oranla su materyalinde  $2 \log_{10}$ , altlık ve yem materyalinde ise  $3,5 \log_{10}$  azalma belirlendi. Yaşam süreleri değerlendirildiğinde ise fajlar su materyalinde 4 hafta, altlık ve yem materyallerinde ise 3 hafta canlılığını korudu. Faj yaşam süresi bulguları materyal açısından değerlendirildiğinde aynı koşullarda olmalarına rağmen en uzun faj yaşam süresi su materyalinde gerçekleştiği görüldü. Bu durumun diğer materyallerle (altlık, yem) kıyaslandığında su materyalinde kurumanın olmamasından, diğer materyallerde ise kuruma meydana geldiği için yüzey geriliminin artması ve buna bağlı olarak faj titrelerinde düşüş meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Sonuç olarak çalışmada seçilen iki fajın konak hücre bulundurmeyen tüm materyallerde uzun yaşam süresine sahip olması dekontaminasyonda kullanılabilirliğini düşündürdü.



Bu çalışmada seçilen iki fajın oda ısısı, 4°C, -20°C ve -80°C'de saklanma ve kullanılabilirlik süresi literatürde ilk defa araştırıldı. Fajların saklama sürelerine ilişkin çeşitli çalışmalar (Warren ve Hatch, 1969; Zierdt, 1988; Ngangbam ve Devi, 2012; Madsen ve ark., 2013; Bourdin ve ark., 2014) yapılmıştır. Fakat çalışmalarda fajların oda ısısında saklama süresi ile ilgili verilere rastlanamamıştır. Bu çalışmada seçilen fajların, oda ısısında (20-22°C) 6 hafta süreyle canlılığını koruduğu fakat titrelerinin logaritmik olarak düzenli bir şekilde azaldığı tespit edildi. Koşullar düşünüldüğünde bu sürenin faj çalışmalarında fajları transfer etmek ve saklamak için uygun bir süre olduğu düşünüldü. Warren ve Hatch (1969)'in T3 kolifajının saklama süresini ve stabilitesini inceledikleri çalışmalarında, T3 kolifajının -20°C'de dondurularak tutulduğunda nispeten stabil olmasına rağmen, 4°C'de 72 gün boyunca saklandığında, titresinde 2 log<sub>10</sub> kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada 4°C'de, ilk 2 ay fajların titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi bununla beraber fajlar, titreleri logaritmik olarak azalarak 9 ay süre ile canlılıklarını korudu. -20°C'de, ilk 10 ay fajların titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi ve toplamda 4 yıl sonunda 8 log<sub>10</sub> azalarak hala yaşamaya devam etti. Bu bulgular Warren ve Hatch (1969) çalışmalarına benzer olarak fajların dondurulduğunda daha stabil olduğu ve daha uzun süre yaşadığını gösterdi. Ayrıca literatür taramalarında rastlanan *Salmonella* fajları üzerine tek çalışma olan Ngangbam ve Devi (2012)'nin çalışmalarında da *Salmonella* fajları 4°C ve -20°C'de 2 hafta gibi kısa süre saklandığında titrelerinin değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, bu çalışmadaki bulgularla birebir uyum göstermektedir. Bu çalışmada, seçilen fajlar -80°C'de saklandıklarında ise ilk yıl fajların titrelerinde herhangi bir değişim görülmedi ve toplamda 4 yıl sonunda 6 log<sub>10</sub> azaldığı fakat hala yaşamaya devam ettiği belirlendi. Ackermann ve ark. (2004), *Brucella*, *Vibrio* ve *Aeromonas* fajlarının -80°C'de sıvı nitrojenle tutulduğunda 5 yıla kadar yaşayabileceğini ve 5 yılda bir çoğaltılması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu açıdan bakıldığında bu çalışmada -80°C'de fajların dördüncü yıl sonundaki ölçümlerde hala yaşamaya devam etmesi bu fajların Ackermann ve ark. (2004)'nin çalışmalarında bildirdikleri verilere benzer olarak 5 yıla kadar yaşayabileceğini düşündürdü. Sonuç olarak çalışmada kullanılan bu iki fajın saklama sürelerinin,

dekontaminasyon ve biyokontrol ajanı olarak kullanımlarında transfer ve saklanma için yeterli olduğu kanısına varıldı.

## Kaynaklar

1. Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. (2004) Long-term bacteriophage preservation. *World Federation for Culture Collections Newsletter*. 38, 35-40.
2. Akhtar M, Viazis S, Diez-Gonzalez S. (2014) Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control*, 38, 67-74.
3. Aksakal A. (2003) Bazı Kanatlıların Dışkılarında *Salmonella* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı ile Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *YYÜ Vet Fak Derg*. 14 (1), 95-101.
4. Anonim. (2018) Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı. Erişim adresi: [https://tuyekad.org.tr/wp-content/uploads/2018/09/ULUSAL\\_SALMONELLA\\_KONTROL\\_PROGRAMI\\_.pdf](https://tuyekad.org.tr/wp-content/uploads/2018/09/ULUSAL_SALMONELLA_KONTROL_PROGRAMI_.pdf) Erişim tarihi: 18.10.2019
5. Atterbury RJ, Van Bergen MAP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA. (2007) Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization Broiler Chickens. *Appl Environ Microbio*. 73, 4543-4549.
6. Bao H, Zhang H, Wang R. (2011) Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Sci*. 90, 2370-2377.
7. Bardina C, Spricigo DA, Cortes P, Lagosteraa M. (2012) Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing *Salmonella* Colonization of Poultry. *Appl Environ Microb*. 78(18), 6600-6607.
8. Borie C, Albala I, Sanchez P, Sanchez ML, Ramirez S, Navarro C, Morales MA, Retamales J, Robeson J. (2008) Bacteriophage Treatment Reduces *Salmonella* Colonization of Infected Chickens. *Avian Dis*. 52, 64-7.
9. Bourdin G, Schmitt B, Guy LM, Germond JE, Zuber S, Michot L, Reuteler G, Brussow H. (2014) Amplification and Purification of T4-Like *Escherichia coli* Phages for Phage Therapy: from Laboratory to Pilot Scale. *Appl Environ Microbiol*. 80(4), 1469-1476.
10. Carey-Smith GV, Billington C, Cornelius AJ, Hudson JA, Heinemann JA. (2006) Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol Lett*. 258, 182-186.
11. Cortes P, Spricigo DA, Bardina C, Llagostera M. (2015) Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett*. 362, 1-7.
12. Duc HM, Minh SH, Ken-Ichi H, Miyamoto T. (2018) Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *Food Sci Tech-Brazil*. 91, 353-360.
13. EFSA. (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *Efsa Journal*, 15(12), 5077



14. EFSA. (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *Efsa Journal*, 14(12),4634
15. Field A. (2009) Discovering Statistics Using SPSS. Third Edition. Dubai: Oriental Press. Chapter 6 p. 166
16. Fiorentin LI, Vieira NDI, Barioni Junior WI, Barros SII. (2004) *In vitro* characterization and *in vivo* properties of *Salmonellae* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. *Rev Bras Cienc Avic*. 6(2), 121-128.
17. Gutierrez D, Martin-Platero AM, Rodriguez A, Martinez-Bueno M, Garcia P, Martinez B. (2011) Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiol Lett*. 322, 90-97
18. Huang C, Virk SM, Shi J, Zhou Y, Willias SP, Morsy MK, Abdelnabby HE, Liu J, Wang X, Li J. (2018) Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophage LPSE1 Against *Salmonella enterica* in Ready to Eat (RTE) Foods. *Front Microbiol*, 9: 1046
19. Hyman P, Abedon ST. (2009) Practical Methods for Determining Phage Growth Parameters. Clokie MRJ, Kropinski AM. eds. *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press, New York. p. 175-202.
20. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson PR. (2009) Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. Clokie MRJ, Kropinski AM. eds. *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press, New York. p. 69-77.
21. Kutter E. (2009) Phage Host Range and Efficiency of Plating. Clokie MRJ, Kropinski AM. eds. *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press, New York. p. 141-151.
22. Madsen L, Bertelsen SK, Dalsgaard I, Middelboeb M. (2013) Dispersal and Survival of *Flavobacterium psychrophilum* Phages *In Vivo* in Rainbow Trout and *In Vitro* under Laboratory Conditions: Implications for Their Use in Phage Therapy. *Appl Environ Microbiol*. 79(16), 4853-4861.
23. Mahmoud M, Askorab A, Barakata AB, Rabiea OEF, Hassanc ES. (2018) Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *Int J Food Microbiol*. 266, 8-13
24. Mirzaei MK, Nilsson AS. (2015) Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS One*, 10(3), e0118557.
25. Nakai T, Sugimoto R, Park KH, Matsuoka S, Mori K, Nishioka T, Maruyama K. (1999) Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis Aquat Org*. 37(1), 33-41.
26. Ngangbam AK, Devi NB. (2012) Molecular Characterization of *Salmonella* Bacteriophages Isolated from Natural Environment and its Potential Role in Phage Therapy. *Banglad J Microbiol*. 29(1), 33-36.
27. Pereira C, Silva YJ, Santos AL, Cunha A, Gomes NC, Almeida A. (2011) Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: survival, host specificity and effect on bacterial community structure. *Mar Drugs*. 9(11), 2236-55.
28. Rahaman MT, Rahman M, Rahman MB, Khan MFR, Hossen ML, Parvej MS, Ahmed S. (2014) Poultry *Salmonella* Specific Bacteriophage Isolation And Characterization. *Banglad. J Vet Med*. 12(2), 107-114.
29. Sanders ME, Klaenhammer TR. (1980) Restriction and modification in group N streptococci: effect of heat on development of modified lytic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol*. 40(3), 500-6.
30. Sengül SS, Türkyılmaz S. (2007) Broylerlerde *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium Enfeksiyonlarının ELISA ve Drag Sıvı Yöntemleri ile İncelenmesi. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*. 4(2), 85-90.
31. Soykut EA, Tunail N. (2009) Süt Endüstrisinde Sorun Yaratan Termofilik Fajlar. *J Food*. 34 (2), 107-113.
32. Spricigo DA, Bardina C, Cortes P, Llagostera M. (2013) Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol*. 165, 169-174.
33. Thung TY, Premarathne JMKJK, Chang WS, Loo YY, Chin YZ, Kuan CH, Tan CW, Basri DF, Radzi CWJWM, Radu S. (2017) Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *Food Sci Tech-Brazil*. 78, 222-225.
34. Warren JC, Hatch MT. (1969) Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols. *Appl Microbiol*. 17(2), 256-61.
35. Wiggins AB, Alexander M. (1985) Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems. *Appl Environ Microbiol*. 49(1), 19-23.
36. Woolston J, Parks AR, Abuladze T, Anderson B, Li M, Carter C, Hanna LF, Heyse S, Charbonneau D, Sulakvelidze A. (2013) Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage*. 3(3), e25697.
37. Zierdt CH. (1988) Stabilities of lyophilized *Staphylococcus aureus* typing bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. 54(10), 2590.

## Kanatlı İntestinal Spiroketozis

Yavuz Çokal<sup>1</sup>, Elçin Günaydın<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bandırma Onyedü Eylül Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksekokulu, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup>Hitit Üniversitesi, Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu, Çorum, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 26.09.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 09.12.2019

**Özet:** Kanatlı intestinal spiroketozis (KİS), ticari yumurtacı ve broyler damızlık tavuklarda, *Brachyspira* cinsine ait patojenik türlerin neden olduğu bir enfeksiyondur. KİS, büyüme geriliğine, yumurta verim kaybına, yem tüketiminde artışa, yumurta kabuğunun dışkı ile kirlenmesine ve yumurta kalitesinin düşmesine neden olarak ekonomik kayıpları oluşturur. Birçok ülkede kanatlılarda *Brachyspira* spp. varlığı ortaya konmuştur. Ülkemizde, bilginiz dâhilinde, KİS şüpheli ve/veya sağlıklı kanatlılardan *Brachyspira* spp. izolasyonu ile ilgili herhangi bir rapor yoktur. Saha gözlemlerimiz, ülkemizde özellikle ticari yumurtacı sürülerde kirliliği yumurta problemlerinin yoğun olduğunu göstermektedir. Bu derleme çalışması ile kirliliği yumurta problemlerine neden olan KİS hakkında bilgi verilmesi ve bu enfeksiyona dikkatin çekilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Brachyspira*, spiroketozis, broyler damızlık, yumurtacı tavuk

### Avian Intestinal Spirochaetosis

**Summary:** Avian intestinal spirochaetosis (AIS) is an infection caused by pathogenic species belonging to *Brachyspira* genus in commercial layer and broiler breeder hens. AIS creates the economic losses in consequence of the growth retardation, decrease in egg production, increase in feed consumption, faecal staining of egg shells and lower egg quality. The presence of *Brachyspira* spp. in poultry has been revealed in many countries. In Turkey, to the best of our knowledge, there are not any reports on the isolation of *Brachyspira* spp. in AIS suspicious and/or healthy avian species. Our field observations shows dirty egg problems are intense in commercial laying hens in our country. This review study aimed to give information about the AIS causing dirty egg problems and draw attention to this infection.

**Key words:** *Brachyspira*, spirochaetosis, broiler breeder, laying chicken

### Giriş

Spiroketlerin kanatlılarda kolonizasyonu ile ilgili ilk veriler 20. yüzyılın başlarında rapor edilmiştir (Stephens ve Hampson 2001). Oluşturduğu enfeksiyonlar (kanatlı intestinal spiroketozis, KİS) ile ilgili ilk bulgular ise 1980'li yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Hollanda'da yapılan çalışmada, ishal semptomları gösteren yumurtacı sürülerin sekum mukoza kazıntılarında spiroketler izole edilmiş ve izolatlar deneysel olarak 10 haftalık tavuklara verildiğinde, tavuklarda sulu dışkı ve gelişme geriliği ile sekumda tiftitise neden olmuştur (Davelaar ve ark. 1986). İngiltere'de yapılan çalışmada ise büyüme geriliği, yumurta veriminde gecikme ve yumurta kabuk kalite bozukluğu olan yarka sürülerin bağırsaklarında spiroketlerin varlığı belirlenmiştir (Griffiths ve ark. 1987). Daha sonraki yıllarda, benzer çalışmalar Avrupa, ABD, Avustralya ve Malezya gibi ülkelerde de yapılmış,

yumurta verim kaybı, kronik ishal, dışkı ile kirliliği yumurta üretimi olan ve ayrıca sağlıklı sürülerde *Brachyspira* spp. varlığı saptanmıştır (Swayne ve ark.1992; Kizerwetter-Şwida ve ark. 2005; Bano ve ark. 2008; Ivanics ve ark. 2009; Myers ve ark. 2009; Amin ve ark. 2014; Mappley ve ark. 2014). Ülkemizde, bilginiz dâhilinde, KİS şüpheli ve/veya sağlıklı kanatlılardan *Brachyspira* spp. izolasyonu ile ilgili herhangi bir rapor yoktur.

### Etiyoloji ve Epizootiyoloji

Daha önce *Treponema* ve *Serpulina* olarak isimlendirilmiş olan (Stanton ve ark. 1991; Ochiai ve ark. 1997) *Brachyspira* cinsi, *Spirochetes* sınıfında yer alan *Brachyspiraceae* ailesi içinde klasifiye edilmektedir (Paster ve Dewhirst 2000). *Brachyspira* türleri gram negatif, oksijen-tolerant anaerob, kanlı agarda β-hemoliz oluşturan, hareketli, helikal kıvrımlı yapıya sahip spiral şekilli bakterilerdir.

Günümüzde *Brachyspira* cinsine ait tanımlanmış 7 tür; *B. hyodysenteriae*, *B. alvinipulli*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii* ve genus içinde olması önerilen türler; *B. canis*, *B. pulli*, *B. suanatina*, *B. corvi*, *B. ibaraki*, *B. rattui*, *B. muridanum* ve *B. muris* bulunmaktadır (Jansson ve ark 2008a, 2008b; Backhans ve ark. 2010; Jansson ve ark 2011). *Brachyspira* türleri bazı memelilerin (örn; domuz, köpek, rodent, insan), evcil ve yabani kanatlıların (örn; tavuk, hindi, kaz, ördek, keklik, sülün) kalın bağırsaklarında kolonize olmaktadır (Koopman ve ark. 1993; Jansson ve ark. 2001; Shivaprasad ve Duhamel 2005; Jansson ve ark 2008b; Hidalgo ve ark 2010). Patojenik türler, domuz dizanterisi, insanlarda ve kanatlılarda intestinal spiroketozis enfeksiyonları oluşturmaktadır (Swayne ve ark. 1995; Backhans ve ark. 2011).

KİS'e tavuklarda kolonize olduğu bilinen 7 türden üçü; *B. alvinipulli*, *B. intermedia* ve *B. pilosicoli* neden olmaktadır ve son iki tür ticari yumurtacı tavuklardan daha sıklıkla izole edilmektedir (Stephens ve Hampson 1999; Bano ve ark 2008; Myers ve ark. 2009). *B. pilosicoli*, aynı zamanda, potansiyel zoonotik patojendir (Hampson ve ark. 2006). Belçika'da süpermarketlerde satılan yumurtacı tavuk karkaslarından *B. pilosicoli*, *B. intermedia* ve non-patojenik türlerin izole edildiği bildirilmiştir (Verlinden ve ark 2012). Domuzlar için oldukça virulent olan "domuz dizanterisi" etkeni *B. hyodysenteriae*'nin tavuklar için patojenik olup olmadığı ile ilgili henüz net bilgi yoktur. Bakterinin Hollanda'da ishal ve verim düşüklüğü bulguları olan ticari yumurtacı sürülerden (Feberwee ve ark. 2008), Macaristan'da KİS hikâyesi olan yumurtacı sürülerden (Ivanics ve ark. 2009), ördek (Jansson ve ark. 2001) ve Amerikan devekuşundan (Jensen ve ark. 1996) izole edildiği bildirilmiştir. Aynı zamanda, deneysel olarak broyler civcivleri enfekte ettiği ve sekumda lezyonlar oluşturduğu rapor edilmiştir (Adachi ve ark. 1985). Bazı araştırmacılar tarafından *B. hyodysenteriae* tavuklar için potansiyel patojenik tür olarak bildirilmiştir (Stephens ve ark. 2005; Medhanie 2011, Roy ve ark. 2015), ancak diğer bazı çalışmalarda ise bakteri tavuklar için patojenik türler arasında bildirilmemiştir. Tavuklar için patojenik olmadığı varsayılan türler *B. innocens*, *B. murdochii* ve *B. pulli*'dir ve her üçü de patojenik türler ile birlikte KİS olgularından izole edilebil-

mektedir (Stephens ve Hampson 2001; Jansson ve Pringle 2011; Verlinden ve ark. 2012).

KİS, özellikle ticari yumurtacı tavukların bir enfeksiyonudur ve broyler damızlık tavukları da etkilemektedir (Stephens ve Hampson 2001). Broyler sürülerde enfeksiyon rapor edilmemiştir. Ancak, enfekte broyler damızlıklardan elde edilen broyler sürülerin, sağlıklı sürülerden elde edilenlere göre, düşük performans gösterdiği bildirilmiştir (Dwars ve ark. 1993; Smith ve ark. 1998). KİS üretim problemlerine neden olmaktadır. Büyüme geriliğine, yumurta verim kayıplarına, yem sindiriminde problemlere, yem tüketiminde artışa ve yumurta kalitesinin düşmesine neden olarak ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Davelaar ve ark. 1986; Griffiths ve ark. 1987; Swayne ve ark. 1992). İngiltere'de, ticari yumurtacı tavuklarda neden olduğu ekonomik kaybın yaklaşık 18 milyon € tahmin edildiği bildirilmiştir (Mappley ve ark. 2014). Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda, KİS klinik bulguları gösteren kümeslerde *Brachyspira* spp. prevalansı daha yüksek bulunmuştur. Hollanda'da KİS klinik bulguları gösteren yumurtacı sürülerde prevalans %28, doğu Avustralya'da yumurtacı ve broyler damızlık sürülerde %70 tespit edilirken, Hollanda'da KİS klinik bulgu göstermeyen sürülerde %4 ve doğu Avustralya'da %15 tespit edilmiştir (Stephens ve Hampson 1999; Kizerwetter-Świda ve ark. 2005). Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda ise, yumurtacı sürülerdeki prevalans batı Avustralya'da %35 (McLaren ve ark. 1996), Polonya'da %50 (Kizerwetter-Świda ve ark. 2005), İtalya'da %71 (Bano ve ark. 2008), İran'da %16.7 (Bassami ve ark. 2012) ve doğu Avustralya'da broyler damızlıklarda %43 (McLaren ve ark. 1996) saptanmıştır.

Ticari sürülerde *Brachyspira* spp. varlığı ile ilgili, sürü yaşı, kümes tipi, gübre atım sistemi, rezervuar hayvanlar ile direkt ya da indirekt temas, yem ve tedavi önemli risk faktörleridir (Bano ve ark. 2008; Harms ve ark 2018). Daha önce yapılan çalışmalar *Brachyspira* spp. varlığının yaş ile birlikte arttığını göstermektedir. Kırk haftalıktan büyük sürülerde, 40 haftalıktan küçüklere göre prevalans daha yüksek bulunmuştur (Bano ve ark. 2008; Myers ve ark. 2009). Kafes tipli kümeslerdeki *Brachyspira* spp. pozitiflik oranı serbest kümeslere göre daha düşük tespit edilirken altlıklı kümeslere göre fark tespit edilmemiştir (Griffiths ve ark. 1987; Jansson ve

ark. 2008b). Gübre çukuru olan kümeslerde, gübreleri konveyör ile taşınanlara göre, *Brachyspira* prevalansı daha yüksek bulunmuştur (Burch ve ark. 2006). Domuz, rodentler, yabani kuşlar, su kuşları *Brachyspira* spp., özellikle *B. pilosicoli* taşıyıcısıdır (Griffiths ve ark. 1987; Backhans ve ark. 2010, 2011). Tavuk sürülerine yabani kuşlar, kemirgenler, böcekler, kedi, köpek ve çiftlik hayvanları (domuz, at) ile diğer kümes hayvanları (ördek, kaz, hindi, sütlün) ve insanlar aracılığıyla bulaşma söz konusu olabilmektedir (Stephens ve Hampson 2002; Hampson ve ark. 2006; Hampson 2018). Bulaşmada aracı çevre ile daha fazla temas halinde olması nedeniyle *Brachyspira* enfeksiyonları özellikle serbest yetiştiricilik yapan tavuk çiftliklerinde daha fazla yaygındır (Wagenaar ve ark. 2003).

### Patogenezis

Bağırsak spiroketozisin patogenezisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu konudaki çalışmalar daha çok geniş konakçı spektrumuna sahip *B. pilosicoli* üzerinde yoğunlaşmıştır ve şimdiki kadar enfeksiyon sürecine katkıda bulunan birkaç virulens faktörü tanımlanmıştır (Roy ve ark. 2015). Enfeksiyon fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Su kuşlarında kontamine sulardan kloakadan retroperistaltik olarak sekal enfeksiyonun gerçekleşebileceği ileri sürülmüştür (Hampson 2018). Ağız yoluyla alınan etken kalın bağırsak lumenine ulaşır. Mide ve ince bağırsakları geçişte mide içeriği ve organik maddelerce korunmaktadır. *B. pilosicoli* flagellaları sayesinde aktif hareketlidir. Bağırsak mukozasında fiziksel bariyer oluşturan mukusa karşı kemotaksisi kodlayan birçok gene sahiptir. Bu sayede mukusa kemoatraksiyon gösterir ve kolonizasyonda önemli avantaj sağlar. Bakteri sialidaz enzimlerine benzer spesifik enzimler sentezler. Bu enzimler sayesinde mukusu hidrolize ederek kolon mukozası boyunca penetre olur ve hücrenin lumen yüzeyine bağlanır. Farklı suşların hem motilitelerinde hem de mukusa yönelik kemotaktik yanıtlarında farklılıklar gösterebileceği, bu durumun kolonizasyon potansiyellerini etkileyebileceği bildirilmiştir (Roy ve ark. 2015). Bakteri yüzey lipoproteinleri hücre yüzeyindeki spesifik reseptörler ile etkileşerek bağlanmayı kolaylaştırırlar. Yaygın bir kolonizasyon meydana geldiğinde, kolonik enterositler boyunca su ve elektro-

lit emilimine fiziksel bir bariyer direnci oluşur ve bu da ishale neden olur (Mapple ve ark. 2014).

### Klinik Belirtiler

Enfekte sürülerde, kronik ishal, özellikle yapışkan veya hafif köpüklü, karamel renkli dışkı, vent bölgesinin kirli-bulaşık olması (pasty vent sendrom), yumurta kabuğunun dışkı ile kirlenmesi ve tavuklarda halsizlik-durgunluk genel bulgulardır. Ayrıca, yumurtlamaya başlamada gecikme, büyüme geriliği, yumurta ağırlığında ve karetenoid içeriğinde azalma da görülebilmektedir (McLaren ve ark. 1997; Stephens ve Hampson 2001; Jansson ve ark. 2001). Hastalıkta, kümesteki hayvanların %5-25'inde (kronik) ishal şekillenebilmektedir (Swayne ve ark. 1992; Stephens ve Hampson 1999; Kizerwetter-Świda ve ark. 2005). Dışkıda renk ve kıvam değişiklikleri meydana gelir ve gaz üretimindeki artıştan dolayı köpüklü bir hal alabilir (cappuccino faeces). İleri durumlarda dışkıda mukus ve kan görülebilir (Roy ve ark. 2015). İshalden dolayı dışkı daha sulu hale geldiğinden yumurta kabuğunun dışkı ile kirlenmesi daha da artmaktadır. Bu nedenle kirli yumurta üretimi olan sürülerde *Brachyspira* spp. prevalansı daha yüksek bulunmaktadır (McLaren ve ark. 1996, Stephens ve Hampson 1999, Bano ve ark. 2008). Ontario/Kanada'da yumurtacı sürülerde yapılan bir çalışmada, kirli yumurta problemi olan sürülerin %63,5'i, temiz sürülerin %24,3'ü *Brachyspira* spp. pozitif bulunmuş ve kirli yumurta problemi ile *Brachyspira* spp. varlığı arasında güçlü bir ilişkinin olduğu rapor edilmiştir (Medhanie ve ark. 2013). Medhanie (2011) *Brachyspira* spp. prevalansının temiz yumurta üreten sürülerde kirli yumurta üretenlere göre %19-56 oranlarında daha düşük olduğunun tahmin edildiğini bildirmiştir.

### Teşhis

KİS klinik bulgularının hafif, değişken ve nonspesifik olması nedeniyle ticari kanatlı sürülerde enfeksiyonun varlığı genellikle fark edilmemekte ve gözden kaçabilmektedir. Sürüde enfeksiyona bağlı olarak şekillenen ishal ve yumurta verim düşüklüğü belirgin bulgular olsa da patognomik değildir. Mikroskopik muayene ile spiroketlerin varlığı, karakteristik morfolojileri ve hareketleri ışık, faz-kontrast ya da karanlık alan mikroskoplarıyla izlenebilir



(Mapple ve ark. 2014). Teşhiste altın standart olarak kabul görmüş bir yöntem yoktur (Harms ve ark. 2018). Yapılan çalışmalarda çoğunlukla kültürel metot ve moleküler yöntemler birlikte kullanılmıştır (Stephens ve Hampson 1999; Kizerwetter-Świda ve ark. 2005; Feberwee ve ark. 2008; Jansson ve ark. 2008a). Doğası gereği nazlı ve yavaş üreyen *Brachyspira* türleri kan ve/veya serum ilave edilmiş katı veya sıvı ortamlarda üreyebilir. İzolasyon için taze dışkı ve klokal svap örneklerinden selektif katı besiyerlerine ekimler yapılır ve anaerobik olarak inkube edilir. Selektif besiyerlerine spektinomisin, rifampisin, polimiksin, kolistin ve vankomisin gibi farklı antibiyotik kombinasyonları ilave edilmektedir (Kunkle ve ark. 1986, 1988; Fellstrom ve ark. 1995). Son dönemde yapılan çalışmalarda, selektif katı besiyeri olarak çoğunlukla farklı antibiyotikler ve defibrine sığır ya da koyun kanı ilave edilmiş Triptikaz Soy Agar kullanılmıştır (Davelaar ve ark. 1986; Phillips ve ark. 2003; Feberwee ve ark. 2008). Pleytler 37°C-42°C’ de 2-5 gün inkübe edilmektedir. 42°C’de inkubasyonun diğer non-spiroketal bakterilerin üremesini inhibe ettiği için daha avantajlı gözüktüğü bildirilmiştir (Stephens ve Hampson 2001; Phillips 2006). Primer pleytten sonra saf kültür elde edilinceye kadar subkültür uygulamasına devam edilmektedir. *Brachyspira* türleri katı besiyerlerinde göze çarpan ayrı koloniler oluşturmazlar, bunun yerine agar yüzeyine yayılmış sis benzeri ince bir film tabakası gibi birleşik bir üreme gösterirler. Kanlı agarda β-hemoliz oluştururlar ve hemoliz oluşumu üreme gözlenmeden önce şekillenebilir (Phillips 2006). İdentifikasyonda, izolatların mikroskopik morfolojileri ile hemoliz, indol, hippurat, α-galaktosidaz, α-glukosidaz ve β-glukosidaz enzim aktiviteleri belirlenmektedir. Enzim aktivitelerini belirlemede daha çok ticari kitler kullanılmaktadır (Kizerwetter-Świda ve ark. 2005; Feberwee ve ark. 2008). Kanatlılarda kolonize olabilen türler arasında *B. hyodysenteriae* güçlü β-hemolitik, diğerleri zayıf β-hemolitik özelliktedir. *B. hyodysenteriae* indol pozitif, ancak bazı izolatların indol negatif olduğu (Hommeze ve ark. 1998) ve bazı non- *B. hyodysenteriae* spiroketlerin de güçlü β-hemolitik olduğu (Neef ve ark. 1994) gösterilmiştir. Yine, ördeklerde *B. hyodysenteriae* yanısıra diğer güçlü β-hemolitik ve indol pozitif spiroketlerin varlığı bildirilmiştir (Jansson ve ark. 2004). *B. pilosicoli* zayıf β-hemolitik ve genel olarak hippurat pozitif, indol negatif-

tir. Domuzlardan hippurat negatif *B. pilosicoli* izole edilmiştir, bu nedenle identifikasyonda hippurat pozitif ve negatif olarak dikkate alınması gerektiği önerilmiştir (Thomson ve ark. 2001). Bazı *B. pilosicoli* insan izolatları indol pozitif bulunmuştur. *B. intermedia* zayıf β-hemolitik, indol pozitif ve “intermedia” ismi biyokimyasal olarak *B. hyodysenteriae* ve *B. innocens* arasında bir pozisyonda olmasından gelmektedir (Stanton ve ark. 1997). Türler arasında olan fenotipik farklılıklardaki bu tür uyumsuzluklar rutin identifikasyon çalışmalarını zorlaştırmaktadır (Stephens ve ark. 2005). Bu nedenle de identifikasyonda moleküler tekniklerin kullanılması önem arz etmektedir. Günümüzdeki çoğu çalışmada, *Brachyspira* türlerinin cins ve tür düzeyinde moleküler identifikasyonunda 16S rRNA, 23S rRNA, NADH oksidaz (*nox*) hedef genlerine dönük dizayn edilmiş Polimeraz Zincir Reaksiyonları kullanılmıştır (Atyeo ve ark. 1999; Suriyaarachchi ve ark. 2000; Jansson ve ark. 2004; Kizerwetter-Świda ve ark. 2005; Phillips 2006; Feberwee ve ark. 2008; Verlinden ve ark. 2012). Son dönemde, *Brachyspira* spp. identifikasyonda daha hızlı ve ucuz bir yöntem olan ve bakteri protein profillerinin (çevresel koşullardan daha az etkilenen ribozomal proteinlerin) çıkarılması esasına dayanan Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) kullanımını bildirilmiştir (Calderaro ve ark. 2013).

## Tedavi ve Korunma

Günümüzde KİS enfeksiyonlarına karşı sıkı biyogüvenlik önlemlerinin alınması ve tedavide antibiyotiklerin kullanılması temel uygulamalardır (Mapple ve ark. 2014; Roy ve ark. 2015). Temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları, etkili rodent, böcek ve yabani kuşların kontrolü, personel girişi ve su kaynaklarının kontrolü gibi önlemlerin alınması önemlidir. Kuaterner amonyum bileşikleri, iodin, klorin ve hidrojen peroksit *Brachyspira* türlerini inaktive eder (Phillips ve ark. 2003). Tedavi amaçlı broyler damızlık ve yumurtacı sürülerde pleuromutilin, makrolid ve linkozamid grubu antibiyotiklerin kullanıldığı ve olumlu etkilerin sağlandığına dair deneme ve saha çalışmaları vardır (Stephens ve Hampson 2002; Burch ve ark 2006; Roy 2016). En yaygın kullanılanı, ribozomun 50S bölgesine bağlanarak protein sentezini inhibe eden bakteriostatik



etkili, pleuromutilin ailesinin bir üyesi olan tiamulin'dir. Burch ve ark. (2006) *B. pilosicoli* kaynaklı KİS enfekte yumurtacı sürülerde yaptığı saha çalışmasında, 5 gün boyunca içme suyuna 12.5 mg/kg dozda tiamulin uygulamasının sürülerde, yumurta üretimi ve yumurta ağırlığı veriminde artış, mortalite de azalma gibi olumlu etkiler yaptığını bildirmiştir. Antibiyotik tedavisinin, özellikle ticari yumurtacı sürülerde, direnç ve yumurtada kalıntı sorunlarına neden olacağına dair kaygılar devam etmektedir. Bu nedenle alternatif tedavi/korunma stratejileri araştırılmıştır. Rekabetçi dışlama mekanizması ile etki gösteren probiyotikler ile ilgili yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır (Mappley ve ark. 2011; Mappley ve ark. 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından çiftlik hayvanların beslenmesinde kullanımı güvenilir olarak kabul edilen *Lactobacillus salivarius* ve *Lactobacillus reuteri* ile yapılan bir çalışmada, her iki laktobasilin *B. pilosicoli*'nin hareketini, üremesini ve hücreye bağlanmasını antagone ettiği görülmüştür. (Mappley ve ark. 2011). Kullanılan ticari bir aşı yoktur. *B. intermedia* HB60 suşundan hazırlanan otojen bakterin aşısı deneysel enfekte edilmiş ticari yumurtacı tavuklarda hastalığı önlememiştir (Amin ve ark. 2009).

## Sonuç

Birçok ülkede tavuklarda KİS varlığı ve oluşturduğu ekonomik kayıplar yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. 2006 yılında Avrupa Birliğine üye ülkelerde profilaktif amaçlı antibiyotik kullanımının yasaklanmasının ardından KİS vakalarında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Mappley ve ark. 2011, Roy ve ark. 2015). Ülkemizde ise bu konuda, bilgimiz dâhilinde, herhangi bir çalışma yoktur. Dolayısıyla KİS enfeksiyonunun ülkemizdeki durumu bilinmemektedir. Saha gözlemlerimiz ise özellikle ticari yumurtacı sürülerde kronik ishal ve kirli yumurta problemlerinin yoğun olduğunu göstermektedir. Ülkemizde bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

- Adachi Y, Sveyoshi M, Miyagawa E, Minato H, Shoya S. (1985). Experimental infection of young broiler chick with *Treponema hyodysenteriae*. *Microbiol Immunol.* 29, 683-688. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1985.tb00872.x
- Amin MM, Phillips ND, La T, Hampson DJ. (2009). Vaccination with an autogenous bacterin fails to prevent colonization by *Brachyspira intermedia* in experimentally infected laying chickens. *Vet Microbiol.* 133, 372-376. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.07.007
- Amin MM, Phillips ND, La T, Robertson ID, Hampson DJ. (2014). Intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonizing flocks of layer and breeder chickens in Malaysia. *Avian Pathology.* 43:6, 501-505. DOI: 10.1080/03079457.2014.966056
- Ateyo RF, Stanton TB, Jensen NS, Suriyaarachichi DS, Hampson DJ. (1999). Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol.* 67, 47-60. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00030-9
- Backhans A, Johansson KE, Fellström C. (2010). Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from wild rodents. *Env Microbiol Rep.* 2(6), 720-772. DOI:10.1111/j.1758-2229.2010.00165.x
- Backhans A, Jansson DS, Aspán A, Fellström C. (2011). Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet Microbiol.* 153, 156-162. DOI:10.1016/j.vetmic.2011.03.023
- Bano L, Merialdi G, Bonilauri P, Dall'Anese G, Capello K, Comin D, Cattoli G, Sanguinetti V, Hampson DJ, Agnoletti F. (2008). Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol.* 37(3), 81-86. DOI:10.1080/03079450802043726
- Bassami M-R, Jamshidi A, Kasaei A, Mohamadi A. (2012). Isolation and Identification of *Brachyspira pilosicoli* from laying hens flocks, using conventional culture and molecular methods in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology.* 4, 29-36.
- Burch DGS, Harding C, Alvarez R, Valks M. (2006). Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin. *Avian Pathol.* 35, 211-216. DOI:10.1080/03079450600711011
- Calderaro A, Piccola G, Montecchini S, Buttrini M, Gorrini C, Rossi S, Arcangeletti MC, Conto FD, Medici MC, Chezzi C. (2013). MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension. *Journal of Proteomics.* 78, 273-280. DOI:10.1016/j.jprot.2012.09.027
- Davelaar FG, Smith HF, Hovind-Hougen K, Dwars RM, Vandervalk PC. (1986). Infectious typhlitis in chickens caused by spirochetes. *Avian Pathol.* 15, 247-258. DOI:10.1080/03079458608436285
- Dwars RM, Davelaar FG, Smit HF. (1993). Infection of broiler parent hens with avian intestinal spirochaetes: Effects on egg production and chick quality. *Avian Pathol.* 22, 693-701. DOI:10.1080/03079459308418957
- Ferberwee A, Hampson DJ, Phillips ND, La T, van der Heijden HMJF, Wellenberg GJ, Dwars RM, Landman WJM. (2008). Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *J Clin Microbiol.* 46 (2), 593-600. DOI: 10.1128/JCM.01829-07

14. Fellstrom C, Petterson B, Uhlen M, Gunnarsson A, Johansson KE. (1995). Phylogeny of *Serpulina* based on sequence analyses of the 16S rRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. *Res Vet Sci.* 59, 5–9. DOI: 10.1016/0034-5288(95)90022-5
15. Griffiths IB, Hunt BW, Lister SA, Lamont MH. (1987). Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with spirochaete infection in pullets. *Vet Rec.* 121, 35-37.
16. Hampson DJ, Oxberry SL, La T. (2006). Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerg Infect Dis.* 12 (5), 869-870. DOI: 10.3201/eid1205.051180
17. Hampson DJ. (2018). The spirochete *Brachyspira pilosicoli*, enteric pathogen of animals and humans. *Clin Microbiol Rev* 31: e00087-17. DOI: 10.1128/CMR.00087-17.
18. Harms M, Schmidt V, Heydel T, Hauptmann J, Ahlers C, Bergmann R, Baums CG. (2018). Differentiation of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens using PCR-based methods and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Vet Diagn Invest.* 30(4), 545–553. DOI: 10.1177/1040638718772319
19. Hidalgo A, Rubio P, Osorio J, Carvajal A. (2010). Prevalence of *Brachyspira pilosicoli* and "*Brachyspira canis*" in dogs and their association with diarrhoea. *Vet Microbiol.* 146, 356-360. DOI:10.1016/j.vetmic.2010.05.016
20. Hommez J, Castryck F, Haesebrouck F, Devriese LA. (1998). Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Vet Microbiol.* 62 (2), 163-169. DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00204-1
21. Ivanics E, Glavists R, Thuma A, Simon A, Berta P, Kaszanyitzky E, Samu P, Dencsö L, Ursu K, Dán A. (2009). Intestinal spirochaetosis (*Brachyspirosis*) in Hungarian laying hen flocks. *Magy Allatorvosok.* 131, 323-330.
22. Jansson DS, Bröjer C, Gavier-Widén D, Gunnarsson A, Fellström C. (2001). *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study Swedish game birds. *Anim Health Res Rev.* 2(1), 93-100. DOI: 10.1079/AHRR200122
23. Jansson DS., Johansson KE., Olofsson T, Rasback T, Vågsholm I, Pettersson B, Gunnarsson A, Fellström C. (2004). *Brachyspira hyodysenteriae* and other strong beta-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Med Microbiol.* 53, 293-300. DOI:10.1099/jmm.0.05488-0
24. Jansson DS, Fellström C, Johansson KE. (2008a). Intestinal spirochetes isolated from wild-living jackdaws, hooded crows and rooks (genus *Corvus*): Provisionally designated "*Brachyspira corvi*" sp. nov. *Anaerobe.* 14, 287-295. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2008.09.002
25. Jansson DS, Fellström C, Råsbäck T, Vågsholm I, Gunnarsson , Ingermaa F, Johansson KE. (2008b). Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. *Vet Microbiol.* 130, 348-362. DOI:10.1016/j.vetmic.2008.02.010
26. Jansson DS, Persson M, Zimmerman U, Johansson KE. (2011). Phenotypic and genetic diversity among intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) in free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*) sampled in southern Sweden. *Syst Appl Microbiol.* 34, 566-575. DOI: 10.1016/j.syapm.2011.10.001
27. Jansson DS, Pringle M. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* spp. isolated from commercial laying hens and free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*). *Avian Pathol.* 40(4), 387-393. DOI:10.1080/03079457.2011.588197
28. Jensen NS, Stanton TB, Swayne DE. (1996). Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). *Vet Microbiol.* 52, 259-269. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)00076-4
29. Kizerwetter-Świda M, Rzewuska M, Binek M. (2005). Characterization of *Brachyspira* sp. strains isolated from flock of hens with diarrhoea. *Bull Vet Inst Pulawy.* 49, 169-173.
30. Koopman MBH, Käsbohrer A, Beckmann G, van der Zeijst BAM, Kustera JG. (1993). Genetic Similarity of Intestinal Spirochetes from Humans and Various Animal Species. *J Clin Microbiol.* 31 (3), 711-716.
31. Kunkle RA, Harris DL, Kinyon JM. (1986). Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol.* 24, 669–671.
32. Kunkle RA., Kinyon JM. (1988). Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol.* 26, 2357–2360.
33. Mappley LJ, Tchórzewska MA, Cooley WA, Woodward MJ, La Ragione RM. (2011). Lactobacilli antagonize the growth, motility, and adherence of *Brachyspira pilosicoli*: a potential intervention against avian intestinal spirochetosis. *Appl Environ Microbiol.* 77, 5402-5411. DOI: 10.1128/AEM.00185-11
34. Mappley LJ, Tchórzewska MA, Nunez A, Woodward MJ, Bramley PM, La Ragione RM. (2013). Oral treatment of chickens with *Lactobacillus reuteri* LM1 reduces *Brachyspira pilosicoli*-induced pathology. *J Med Microbiol.* 62, 287–296. DOI:10.1099/jmm.0.051862-0
35. Mappley LJ, La Ragione RM, Woodward MJ. (2014). *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Vet Microbiol.* 168, 245-260. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.11.019
36. McLaren AJ, Hompson DJ, Wylie SL. (1996). The prevalence of intestinal spirochetes in poultry in Western Australia. *Aust Vet J.* 74, 319-321. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1996.tb13792.x
37. McLaren AJ, Trott DJ, Swayne DE, Oxberry SL, Hompson DJ. (1997). Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J Clin Microbiol.* 35, 412-417.
38. Medhanie GA. (2011). The epidemiology of *Brachyspira* species in Ontario layer chicken flocks. Master of Science, The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
39. Medhanie GA, McEwen SA, Weber , Sanei B, Cooley L, Houghton S, Slavic D, Guerin MT. (2013). Risk factors associated with the colonization of Ontario layer chicken

- flocks with *Brachyspira* species. *Prev Vet Med.* 109, 304-311. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.09.017.
40. Myers SE, Dunn PA, Philips ND, La T, Hampson DJ. (2009). *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* are commonly found in older laying flocks in Pennsylvania. *Avian Dis.* 53, 533-537. DOI: 10.1637/8900-042709-Reg.1
  41. Neef NA, Lysons RJ, Trott DJ, Hampson DJ, Jones PW, Morgan JH. (1994). Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. *Infect Immun.* 62, 2395-2403.
  42. Ochiai S, Adachi Y, Mori K. (1997). Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. *Microbiol Immunol.* 41, 445-452. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1997.tb01877.x
  43. Paster BJ, Dewhirst FE. (2000). Phylogenetic Foundation of Spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2 (4), 341-344.
  44. Phillips ND, La T, Hampson DJ. (2003) Survival of intestinal spirochaete strains from chickens in the presence of disinfectants and in faeces held at different temperatures. *Avian Pathol.* 32(6), 639-643. DOI: 10.1080/03079450310001610677
  45. Phillips ND. (2006). Diagnosis, molecular epidemiology and control of avian intestinal spirochaetosis, Doctor of Philosophy, Murdoch University, Western Australia.
  46. Roy CIL, Mappley LJ, Ragione RML, Woodward MJ, Claus SP. (2015). *Brachyspira pilosicoli*-induced avian intestinal spirochaetosis. *Microb Ecol Health D.* 26:1, 28853 DOI: 10.3402/mehd.v26.28853
  47. Roy CL. (2016). Impact of tiamulin against *Brachyspira pilosicoli* induced avian intestinal spirochaetosis. Doktora Tezi, School of Food, Chemistry and Pharmacy, The University of Reading.
  48. Shivaprasad HL, Duhamel GE. (2005). Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial turkeys. *Avian Dis.* 49 (4), 609-613. DOI: 10.1637/7383-052005.1
  49. Smith HF, Dwars RM, Davelaar FG, Wijtten GAW. (1998). Observations on the influence of intestinal spirochaetosis in broiler breeders on the performance of their progeny and on egg production. *Avian Pathol.* 27, 133-141. DOI:10.1080/03079459808419314
  50. Stanton TB, Jensen NS, Casey TA, Tardoff LA, Dewhirst FE, Paster BJ. (1991). Reclasification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 41, 50-58.
  51. Stanton TB, Fournie-Amazouz E, Postic D, Trott DJ, Grimont PAD, Baranton G, Hampson DJ, Saint Girons I. (1997). Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 1007-1012.
  52. Stephens CP, Hampson DJ. (1999). Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in Eastern Australia. *Avian Pathol.* 28, 447-454. DOI: 10.1080/03079459994461
  53. Stephens CP, Hampson DJ. (2001). Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Anim Health Res Rev.* 2(1), 83-91. DOI: 10.1079/AHRR200116
  54. Stephens CP, Hampson DJ. (2002). Evaluation of tiamulin and lincomycin for the treatment of broiler breeders experimentally infected with the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli*. *Avian Pathol.* 31, 299-304. DOI:10.1080/03079450220136501
  55. Stephens CP, Oxberry SL, Nyree D, Phillips ND, La T, Hampson DJ. (2005). The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonising hens in commercial flocks. *Vet Microbiol.* 107, 149-157. DOI:10.1016/j.vetmic.2005.01.011
  56. Suriyaarachchi DS, Mikosza ASJ, Atyeo RF, Hampson DJ. (2000). Evaluation of a 23S rDNA polymerase chain reaction assay for identification of *Serpulina intermedia*, and strain typing using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 71, 139-148. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00153-4
  57. Swayne DE, Bermudez AJ, Sagartz JE, Eaton KA, Manfort JD, Stoutenburg JW, Hayes JR. (1992). Association of cecal spirochetes with pasty wents and dirty eggshells in layer. *Avian Dis.* 36, 776-781. DOI: 10.2307/1591784
  58. Swayne DE, Eaton KA, Stoutenburg J, Trott DJ, Hampson DJ, Jensen NS. (1995). Identification of a New Intestinal Spirochete with Pathogenicity for Chickens. *Infect Immun.* 63, 430-436.
  59. Thomson JR, Smith WJ, Murray BP, Murray D, Dick JE, Sumption KJ. (2001). Porcine enteric spirochete infections in UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Anim Health Res Rev.* 2, 31-36.
  60. Verlinden M, Pasmans F, Garmyn A, De Zutter L, Haesebrouck F, Martel A. (2012). Occurrence of viable *Brachyspira* spp. on carcasses of spent laying hens from supermarkets. *Food Microbiol.* 32, 321-324.
  61. Wagenaar J, Van Bergen M, van der Graaf L, Landman W. (2003). Free-range chickens show a higher incidence of *Brachyspira* infections in the Netherlands. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, April 2-4, Eddleston, Scotland, UK.



## Lumpy Skin Disease\*

Arif Karaoçtu, Yakup Yıldırım

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.10.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 09.12.2019

**Özet:** Lumpy skin disease (LSD, Sığırların nodüler ekzantemi hastalığı), vektörler tarafından bulaştırılan ve önemli ekonomik kayıplara neden olan viral bir hastalıktır. Genç sığırlar hastalıktan daha fazla etkilenir ve bu hayvanlarda enfeksiyonun morbidite ve mortalite oranları oldukça yüksektir. Genellikle baş, boyun, genital bölge, perineum, scrotum, meme ve bacaklarda deri nodülleri görülür. Bu derlemede, LSD'nin dünyada ve Türkiye'deki durumu, etiyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi ve patolojisi, klinik bulguları, tanısı, tedavisi, koruma ve kontrolü hakkında bilgi verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Deri nodülü, Lumpy Skin Disease, sığır

### Lumpy Skin Disease

**Abstract:** Lumpy skin disease (LSD) is a viral disease that is transmitted by vectors and causes significant economic losses. Young cattle are more affected by the disease and the morbidity and mortality rates in these animals are quite high. Skin nodules are generally occur on the head, neck, genital area, perineum, scrotum, breast and legs. This review gives information about situation of the LSD in the world and in Turkey, etiology, epidemiology, pathogenesis and pathology, clinical presentation, diagnosis, treatment, the protection and control.

**Key words:** Cattle, Lumpy Skin Disease, skin nodule

### Giriş

Lumpy skin disease virusu (LSDV), *Poxviridae* ailesindeki *Chordopoxvirinae* alt ailesinden *Capripoxvirus* generi içinde yer almaktadır (Coetzer 2004; Gibbs 2005). Hastalık ilk olarak 1929'da Afrika kıtası ülkelerinden Zambiya'da görülmüş ve toksite veya insekt ısırmasına bağlı olarak gelişen hipersensitivite olduğu sanılmıştır. Ayrıca enfeksiyon pseudo-urtcaria, neethling, knopvelsiekte ve Afrika hastalığı isimleriyle de bilinmektedir. Özellikle son yıllarda baraj göllerinin artması ve sulu tarım yapılan alanların yaygınlaşması sonucu, sokucu sinek popülasyonundaki artışa bağlı olarak vektörler aracılığı ile aktarılan hayvan enfeksiyonlarındaki artış dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Bin dokuz yüz elli altı yılına kadar Güney Afrika bölgesinde sınırlı kalan enfeksiyon 1974 yılında Batı Afrika'da tespit edilmiştir (Davies 1991). Sığırların nodüler ekzantemi (Lumpy skin disease, LSD) Afrika kıtasında Cezayir, Fas, Tunus ve Libya hariç diğer ülkelerde hastalığın yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir. Bu hastalık 1988 yılından itibaren Mısır'da tespit edilmiş, 1989 yılında İsrail'de ortaya çıkmıştır ve o zamandan beri sporadik olarak

Orta Doğu ülkesinde bildirilmiştir. 1989'daki bu salgından yaklaşık 18 yıl sonra 2006'da tekrar Mısır ve İsrail'de görülmüştür. Hastalık 2012'de İsrail'in kuzey-doğu sınırında yeniden ortaya çıkmış olup akabinde Orta Doğu'da benzeri görülmeyen salgınlar meydana gelmiştir. Lübnan, Filistin Özerk Bölgeleri, Ürdün, Kuveyt, Suudi Arabistan, Irak ve İran'da da salgınlar bildirilmiştir (FAO 2013; OIE 2019a).

Türkiye'de ilk olarak 6 Ağustos- 9 Ekim 2013 yılında Kahramanmaraş ve Batman illerinde ortaya çıkmış ve 4 mihrak bildirim yapılmıştır (FAO 2013). Takip eden yıllarda da zaman zaman görülen enfeksiyonla ilgili olarak 2018 yılında 32 hastalık mihrakı tespit edilmiştir (OIE 2019c). Dört Ocak-2019 dan 9 Ekim 2019 kadar geçen sürede de ülkemizde 131 vaka bildirim yapılmıştır. Bu son verilerle birlikte 2013 yılından itibaren üç yıllık süre içinde ülkemizde etkilenmeyen hiçbir bölge kalmamıştır ve ülkemizde hala endemik olarak devam etmektedir. Ekim 2019 itibari ile bildirim yapılan vakaların 14 tanesi dışında kalan 117 vaka Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgesinden yapılmıştır. Bu 117 mihrakında %80 yakını Güney Doğu Anadolu

\*İlk yazarın yüksek lisans seminerinden özetlenmiştir.

**Yazışma adresi / Correspondence:** Yakup Yıldırım (ORCID: 0000-0003-4443-3337), Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji AD, İstiklal Yerleşkesi. Burdur E-posta: yyildirim@mehmetakif.edu.tr



bölgesinden olmuştur (Saraç 2019). Ülkemizde aktif olarak LSD mücadele programı uygulansa da halen LSD mihraklarının görülmesinin nedeni olarak, sınır komşularımızda bu hastalıkla ve vektörleriyle aktif mücadelenin yapılmaması (Irak, Suriye) en önemli faktördür. Ülkemizde 2014 yılından itibaren ihbarı zorunlu hastalıklar listesine eklenmiş LSD ile ilgili olarak 2017 yılında başlatılan, 3 yıllık bir Avrupa Birliği Projesi kapsamında, 3 aylık yaştan büyük tüm sığırlar aşılama programına alınmıştır. Ayrıca bu proje kapsamında LSD'nin kontrol ve önlenmesine yardımcı olmak amacıyla teknik destek ve laboratuvar ekipmanı desteği de sağlanmaktadır (FAO 2013; GKGM 2019; OIE 2019a; Saraç 2019). Türkiye'deki salgının ardından Kıbrıs, Azerbaycan, Ermenistan'ın kuzey bölgelerinde ve Kazakistan'da yeni salgınlar bildirilmiştir. Son zamanlarda Dağıstan, Çeçenya, Krasnodar Krayı, Kalmykiyan Cumhuriyeti, Güney Rusya ve Güney Osetya'da da LSD vakaları bildirilmiştir. Hastalık beklenildiği gibi 2015 yılında Türkiye'den Yunanistan'a geçmiş; ardından 2016 yılında Bulgaristan, Makedonya, Sırbistan, Arnavutluk, Karadağ ve Kazakistan'da yeni salgınlar ortaya çıkmıştır. Türkiye'den komşu ülkelere geçişte çevresel faktörler, vektör biyolojisi ve iklimsel şartların etkisi olduğu tahmin edilmektedir. LSD şu anda Kafkasya ve Güneydoğu Avrupa'da aktif olarak bulunmakta ve daha da yaygınlaşma riski taşımaktadır (OIE 2019a).

Bu çalışmada, sığırlarda vektör kaynaklı bir hastalık olan lumpy skin disease hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

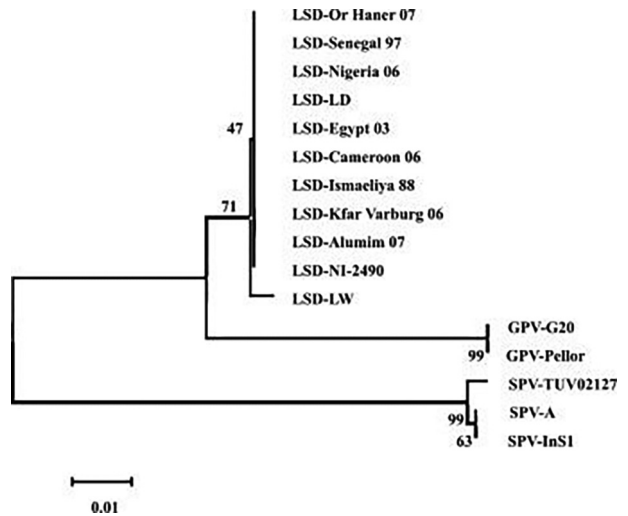
## Etiyoloji

*Capripoxvirus* genusundaki LSDV genomu çift iplikçikli, linear DNA'lı, zarflı, görünümü tuğla şeklinde ve yaklaşık olarak 300x270x200 nm ebatlarındadır. Virusun yaklaşık 150 kb'lik DNA genomuna sahip olduğu bildirilmektedir (Coetzer 2004; Gibbs 2005). Viral genomun 156 tane gen içerdiği bildirilmektedir. Bu genler tarafından kodon uzunlukları 53 ile 2025 aminoasit arasında değişen farklı proteinler kodlamaktadır. LSDV genomunun orta bölgeleri %65 oranında diğer memeli poxvirus genomları ile amino asit benzerliği gösterirken DNA'nın uç bölgelerindeki aminoasit dizilimleri değişiklik göstermektedir. Bu değişik gen gruplarının konakçı

türünü ve virulens bilgilerini içerdiği düşünülmektedir (Tulman ve ark. 2001).

LSDV pH 8.5'te çok katlı kapsül yapısı ve pH 6.5'te fosfotungstik asit ile boyandığında yüzeyindeki geniş filament ağları görülebilir. Virus, uranil asetat ile boyandığı zaman ise bir çift lateral organ ve dambıl şeklinde çekirdeği tespit edilebilir. Virusun nükleik asidi acridine turuncusu ve Feulgen boyama tekniği ile boyanarak belirlenebilir (Woods ve ark. 1990).

LSDV koyun çiçeği ve keçi çiçeği viruslarıyla yakın antijenik ilişki içerisinde (Kara ve ark. 2003; Gibbs 2005). Bu üç virus arasındaki genetik benzerlik düzeyi %95'ten fazladır ve bu sebeple rutin virus nötralizasyon testi ve diğer serolojik testler ile birbirlerinden ayırt edilemezler (Abutarbush ve ark. 2013). *Capripoxvirus* genusunda bulunan virusları birbirinden ayırt edebilmek için DNA uçlarındaki 466 bp'lik bölgenin filogenetik analizi ve P32, GPCR, RPO30 genlerinin filogenetik analizlerinin yapılması gerekir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda LSDV'nin keçi çiçeği virusuna, koyun çiçeği virusundan daha yakın olduğu bildirilmiştir (Stram ve ark. 2008) (Şekil 1).



Şekil 1. *Capripoxvirus* genusundaki virusların genetik analizi. LSD: Lumpy skin disease; GPV: Keçi çiçeği virusu; SPV: Koyun çiçeği virusu (Body ve ark. 2012).

LSDV normal çevre koşullarında inaktivasyonu karşı çok dirençlidir. Etken nekrotik deri nodüllerinde 33 güne kadar, kuru yara kabuklarında 35 güne kadar, hava ile kurutulmuş hayvan derisinde 18 güne kadar aktivitesini koruyabilir (Kara ve ark.

2003). Bu virus güneş ışığına ve deterjanlara duyarlıdır. Kontamine hayvan barınaklarında, karanlık çevre koşullarında aylarca virulensini korur. Virus 55°C'de 2 saatte, 65°C'de 30 dakikada inaktivasyona uğrar. LSDV, deri nodüllerinde -80°C'de 10 yıl, enfekte doku kültürü sıvısında 4 °C'de 6 ay boyunca saklanabilir. Virus yüksek alkali ve düşük asit pH'ya duyarlıdır. 37°C'de pH 6,6-8,6'da 5 gün boyunca virulensini koruyan etken, %1'lik formol, %2'lik fenol, %20'lik eter, %2-3'lük sodyum hipoklorit ve %2'lik virkon gibi bazı dezenfektanlara karşı duyarlılık gösterir (OIE 2019b).

LSDV'nin laboratuvar ortamında üretilmesi için kuzu ve dana böbrek, dana ve kuzu testis, koyun böbrek, kuzu ve buzağı adrenal ve tiroit hücre kültürleri kullanılmaktadır. Virus inokulasyondan 11 gün sonra sitopatolojik etki oluşturarak kendini belli eder ve çoğalırken intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği oluşturur (Coetzer 2004; Babiuk ve ark. 2009).

## Epidemiyoloji

LSDV'nin doğal konakçısı sığırlardır. Hastalığa karşı ince derili *Bos taurus* ırkı sığırlar, *Bos indicus* sığırlarına göre daha duyarlıdır ve en çok laktasyondaki inekler hastalıktan etkilenirler. Yaş gruplarına göre de, genç sığırlar hastalıktan daha fazla etkilenir ve bu hayvanlarda enfeksiyonun morbidite-mortalite oranları oldukça yüksektir (Murphy ve ark. 1999; Radostits ve ark. 2007). Bu hastalıkta yabancı ruminantların rolü hala netleştirilememiştir. Afrika'da bulunan 44 yaban hayatı türünde antikor taraması yapılmış ve 6 hayvan türünde antikor tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda zürafa ve impalaların deneysel enfeksiyonlara duyarlı oldukları bildirilmiştir (Murphy ve ark. 1999; Radostits ve ark. 2007; OIE 2019b).

2011 yılında Mısır'da yapılan bir çalışmada, yerli ırk sığırların, kültür ırkı sığırlara göre daha az duyarlı olduğu ortaya konulmuştur (Salib ve Osman 2011).

Türkiye'de 2013-2014 yılları arasında Hakkâri, Malatya, Şırnak, Batman illerinde bulunan 8 işletmede yapılan çalışmada (Gürçay ve ark. 2015); 250 adet Simental, Holstein Melezi ve Holstein ırkı sığırın 113 adedinin LSD klinik semptomu gösterdi-

ği belirlenmiş ve bu sığırların 12 tanesinden alınan deri biyopsi materyalinde PCR yöntemiyle nükleik asit tespiti yapılarak klinik teşhis doğrulanmıştır. Bu araştırmanın sonucunda, işletmelerde enfeksiyonun mortalitesi %0-26 oranları arasında, morbiditesi ise %3,8-51 oranları arasında bulunmuştur. Bu çalışmaya göre bölgede LSD enfeksiyonunun morbidite oranının düşük çıkmasının sebebi hastalığın sığırdan sığıra bulaşmasından ziyade insekt vektörlerin bulaşmada daha aktif rol almasına bağlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada Simental ve Holstein Melezi ırkı sığırların Holstein sütçü ırkına göre hastalıktan daha az etkilendikleri belirtilmiştir.

Etkenin dayanıklılığı ile ilgili olarak Irons ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada ise virusun boğa spermasında 42. güne kadar aktif olarak kaldığı ve spermada 159. güne kadar viral genomunun tespit edilebildiği ortaya konulmuştur.

LSDV çoğunlukla sivrisinek, karasinek ve keneler yoluyla vektörel olarak bulaştırılır (OIE 2019b). Bulaşma daha az olarak direkt temas, tükürük, burun akıntısı, süt ve enfekte boğa semeni ve patlamış deri nodülleri ile de olur (Barut 2015). Son yıllarda dişi *Aedes aegypti* sineğinin hastalığı bulaştırdığı ancak *Culicoides nubeculosus*, *Culex quefasciatus* ve *Anopheles stephensi* türü sineklerin bulaştırmada rol almadığı bildirilmiştir. Ayrıca *Rhipicephalus appendiculatus* ve *Amblyomma hebraeum* türü kenelerinin hastalığı mekanik veya intrastadial yolla; *Rhipicephalus decoloratus* türü kenelerin de hastalığı transovarial ve transstadial yolla bulaştırdıkları belirlenmiştir (Chihota ve ark. 2001; Chihota ve ark. 2003; Tuppurainen ve ark. 2005; Tuppurainen ve ark. 2011; Lubinga ve ark. 2014a; Lubinga ve ark. 2014b).

LSD salgınları çoğunlukla vektörlerle meydana geldiği için genellikle enfeksiyon mevsimsel olarak görülmektedir. Nemli ve sıcak iklim koşulları insekt vektör popülasyonlarının artışına neden olduğundan rakımı düşük bölgelerde ve sulak alanlarda enfeksiyonun görülme sıklığının daha fazla olduğu bildirilmektedir. Bulaşmada ve yayılmada küresel ısınmanın etkisi büyüktür. Küresel ısınmanın insekt vektörlere ve çevreye etkisi sonucu hastalık Afrika kıtasında başlamış olup yıllar içinde kuzeye doğru yayılmış ve Avrupa kıtasının ortalarına kadar ilerlediği düşünülmektedir (OIE 2019a).

Morbidite ve mortalite genç hayvanlarda ve laktasyondaki ineklerde en yüksektir ve genel mortalite %10-58 oranları arasında bildirilmiştir (Murpy ve ark.1999). Morbidite ise %5-45 oranları arasında değişiklik göstermektedir (OIE 2019b). LSD'nin insanlara bulaşığına dair yeterli kanıt bulunmamaktadır.

### Patogenez ve Patoloji

Virusun inkübasyon süresinin 1-4 hafta arasında değişti bildirilmektedir (Coetzer 2004). İnkübasyon periyodunu takiben ilk olarak bifazik ateş görülür. Viremi ilk ateşten sonra ortaya çıkar, 5 gün kadar devam eder ve 7.-19. günlerde çapı 10-50 mm arasında olan tipik deri nodülleri oluşur (Vorster ve Mapham 2008; Hailu ve Alemayehu 2015; OIE 2019a). Bu nodüller genellikle baş, boyun, genital bölge, perineum, scrotum, meme ve bacaklarda görülür (Barut 2015; OIE 2019b). Ayrıca ağızda, sindirim kanalında ve tracheada da nodüller bulunabilir. Nodüllerin içi başlangıçta seröz sıvı ile doludur, daha sonra bu lezyonlar epidermis, dermis, deri altı dokuya ve kas katmanına inen sit-fasts adı verilen koyu renkli nekroz odaklarına dönüşür. Virus epitelial, endotelial, perisit ve fibroblast hücrelerini etkiler. Ayrıca dermiste vasculitis, trombozis, infarksiyon, makrofaj, lenfosit ve eozinofilin filtrasyonlarına neden olur. Histopatolojik muayenede epidermiste nekroz ve skuamöz epitel hücrelerinde balonumsu dejenerasyon ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri görülür (Burdin 1959; OIE 2019b).

Türkiye'de Uyar ve ark. (2015) LSD ile ilgili yaptıkları bir çalışmada histopatolojik olarak; epidermis ve kıl folikül epitel hücrelerinde dejenerasyon, hiperplazi, akantozis, dermiste vaskülit, trombozlar, ödem, multifokal nekrozlar, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonlarının şekillendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, dermis ve subkutisteki yangısal hücre infiltrasyonları içinde koyun çiçeği hücrelerine benzer şekilde histiyosit benzeri makrofajlar tespit edilmiş olup, epidermis ve kıl folliküllerinin epitel hücrelerinin marjinal kromatinli ve vakuoler nükleuslu çekirdekleri gözlenmiştir ve makrofajlarda eozinofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kas demetleri arasında ve damarlar çevresinde yoğun makrofaj ve lenfoplazmasiter hücre

infiltrasyonu ve multifokal nekrozlar ile karakterize miyozitis olgusu gözlemlenmiştir.

### Klinik Bulgular

Enfeksiyonda, 1-2 hafta arası süren asemptomatik inkübasyon periyodunu, göz kapaklarının şişmesi ve mukuslu burun akıntısı ile birlikte yaklaşık 42°C'ye kadar çıkan ateş dönemi izler. Bu bifazik ateşe bağlı olarak yem ve su tüketiminde azalma, salya akıntısı, önce seröz sonraları mukopurulent göz ve burun akıntısı şekillenir (Kara ve ark. 2003; Gibbs 2005; Babiuk ve ark. 2008). Yüzeysel lenf yumrularında büyümeyi takiben deride yaygın olarak büyüklükleri 0,5-0,7 cm çapında multiple nodüller oluşur. Bu nodüller genellikle baş ve boyun bölgesinde (Şekil 2) ve ağırlıklı olarak derinin kılsız bölgelerinde görülür ama bütün vücuda da yayılabilir. Generalize nodüller 4-5 aylık genç hayvanlarda daha çok görülür. Pnömoni, mastitis, boğalarda orşitis ve buna bağlı olarak infertilite oluşabilir. Yine gebe hayvanlarda enfeksiyona bağlı olarak yavru atma olguları meydana gelebilir (Barut 2015). Bir veya iki gözde birden korneada ülseratif lezyonlar oluşabilir ve ciddi durumlarda bu vakalar körlüğe kadar varabilir (Murpy ve ark.1999; OIE 2019a). İştahsızlık, halsizlik, hareket etmede isteksizlik, depresyon, hızla zayıflama, laktasyondaki hayvanlarda süt veriminde azalma, gebelerde yavru atma, tendonlarda oluşan yangı, nekroz ve bacaklarda oluşan ödem nedeniyle topallık şekillenebilir (Barut 2015; OIE 2019a; OIE 2019b) (Şekil3).



Şekil 2. Genç bir sığırdan baş ve boyun bölgesinde görülen LSD nodülleri (Karaoçtu A., Yıldırım Y.)





**Şekil 3.** Genç bir sığırdada generalize LSD nodülleri ve arka ayaklarda ödem (Karaoçtu A., Yıldırım Y.)

### Tanı

Derideki tipik nodüller ve klinik tablo ön tanı için yeterlidir, ancak kesin tanı laboratuvarında virolojik ve serolojik testler ile mümkündür (Murphy ve ark.1999; OIE 2019b). Marazi madde olarak deri nodüllerinden alınan biyopsi materyali, lenf düğümü, yara kabukları, kan, semen, süt, nodüllerin içindeki sıvı ve deri kazıntıları (PBS içinde), ateşli dönemde alınan kan EDTA'lı tüpler içinde laboratuvara soğuk zincirde gönderilmelidir (Coetzer 2004; OIE 2019a). Bu marazi maddeler içinde virus tespiti için en uygun olanı hastalığın başlangıcından hastalığın üçüncü ayına kadar fazla miktarda virüs içeren deri nodülü biyopsi materyali olduğu bildirilmiştir (Sharawi ve Abd El-Rahim 2011; Body ve ark. 2012; OIE 2019b). Kesin teşhis PCR ve real time PCR ile virusa ait DNA'nın tespiti ile gerçekleştirilmektedir (Barut 2015; OIE 2019a; OIE 2019b).

Laboratuvarında etken identifikasyonu için hücre kültürlerinde virus izolasyonu, transmission elektron mikroskop (TEM) incelemelerine PCR yöntemleri, serolojik olarak virus nötralizasyon testi (VNT) valide edilmiş tek testtir, agar gel immunodifüzyon (AGID) ve indirekt floresan antikor testi (FAT) diğer poxviruslarla kros reaksiyon göstermelerinden dolayı VNT'e göre daha düşük spesifiteye sahiptirler. Western blot testi sensitif ve spesifik olmakla birlikte uygulaması güç ve pahalı bir yöntemdir (OIE 2017; OIE 2019a; OIE 2019b).

Biyopsi materyalleri fosfotungstik boya ile boyanarak elektron mikroskopunda virus parçacıkları görülebilmektedir (Woods ve ark. 1990). Boğalarda

yapılan incelemelerde klinik enfeksiyon sonrası 10-33. günler arası TEM ile yapılan incelemelerde LSDV tespit edilmiştir. TEM, LSDV tanısında güvenilir ve hızlı bir yöntemdir ancak az miktarda kullanılan biyopsi materyalinde virus konsantrasyonunun az olması ve örneklerin hazırlanmasında hata riskinin fazla olması nedeniyle kullanışlı değildir (Tuppurainen ve ark. 2005).

Capripoxvirus antikorları tespiti için ELISA yöntemi de kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda ısı ile inaktive edilmiş koyun çiçek virusu kullanılarak antikor ELISA protokolleri geliştirilmiştir. Ama rekombinant antijenlerin stabil olmaması ve uygun miktarda virus üretilememesi sebepleriyle uygulanamamıştır (Babiuk ve ark. 2009).

Hücre kültürlerinde atenüe edilen LSDV kullanılarak geliştirilen indirekt-ELISA testi ile yapılan bir çalışmada (Awad ve ark. 2010) ateşli dönemde olan sığırların serum örneklerinin %11'inde, klinik enfekte olan sığırların serum örneklerinin %56'sında antikor tespit edilmiştir.

Tanı yöntemleri içinde PCR ve real-time PCR hızlı ve güvenilir olan yöntemlerdir (Ireland ve Binopal 1998; Heine ve ark. 1999; El-Kholy ve ark. 2008; Gelaye ve ark. 2013; Özgünlük ve ark. 2014; Barut 2015). Jel bazlı PCR uygulamaları LSDV teşhisinde güvenilir ve ucuz bir yöntem olmasına karşın zahmetli ve uzun süren uygulamadır. Real-time PCR pratikte daha kullanışlıdır (Tuppurainen ve ark. 2011). LSDV'nin diğer capripoxviruslardan ayrımı için çift hibridizasyon probu kullanılarak geliştirilen real-time PCR protokolü kullanılabilir (Le Goff ve ark. 2005; Lamien ve ark. 2011). PCR protokolü ile virus tanımlaması yapmak için LSD virusunun timidinkinaz (TM) ve ORF132 gen bölgelerini tanımlayıcı iki adet primer çifti kullanılarak 492 bp bantlar elde edilmektedir (Tageldin ve ark. 2014).

İmmunohistokimyasal boyama yöntemiyle monoklonal antikorlar kullanılarak *Amblyomma hebraeum* ve *Rhipicephalus appendiculatus* türü kenelerin organlarından viral antijenler tespit edilebileceği bildirilmiştir (Lubinga ve ark. 2014b).

### Tedavi ve Koruma

Enfeksiyona özgü bir tedavi metodu yoktur. Ancak sekonder enfeksiyonlara karşı antibiyotikler verile-



bilir. Semptomatik tedavi amacıyla da antiinflamatuar ilaç kullanımı tavsiye edilebilir (Gibbs 2005).

Hayvanları LSD hastalığından korumada en etkili yol aşılama değildir. Bu amaçla LSDV suşu olan Neethling ile üretilmiş ticari aşılar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra koyun çiçek ve keçi çiçek viruslarının LSDV'ye antijenik yakınlıklarından dolayı, bu virüslere karşı hazırlanmış aşılar da LSD virusuna karşı (heterelog aşı) korumada kullanılabilir (Saraç 2019).

Mücadelede hijyen tedbirleri ve dezenfeksiyonda önemlidir. Virus zarlı yapısından dolayı eter ve kloroforma duyarlıdır. Direkt güneş ışınlarına karşı duyarlı olan etken karanlık ve serin yerlerde oldukça uzun bir süre enfeksiyözitesini koruyabilir. Yüksek alkali ve düşük asidik solüsyonlara karşı dirençsizdir. Dezenfeksiyon amacıyla özellikle %1'lik formol, %2'lik fenol, %20'lik eter ve %2-3'lük sodyum hipoklorit gibi maddeler tavsiye edilmektedir (Kara ve ark. 2003; OIE 2019b).

Ülkemizde LSD'ye karşı, üç aylık yaştan büyük tüm sığır cinsi hayvanlara koyun-keçi çiçek aşısı (Bakırköy suşu), 3 veya 5 koyun-keçi dozu olarak uygulanmaktadır (Saraç 2019). Ayrıca, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün, 2019 yılı "Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesine" göre genel hastalık belirtileri ile birlikte ateşi olmayan ve orta derecede deri lezyonu gösteren hayvanlara ait karkasların, şarta tabi olarak değerlendirilmeleri gerekir. Bunun yanında bu hayvanların lezyonlu organ ve karkas kısımları ile yapılan antemortem muayenede ateşle birlikte generalize akut enfeksiyon gösteren hayvanların karkasları imha edilmelidir. Bunun yanı sıra, kesim yapılan yerlerin kesim sonu temizlik ve dezenfeksiyonunun yapılmasının gerekliliği de genelgede belirtilmiştir (GKGM 2019).

## Sonuç

Bu derlemede, LSD'nin dünyada ve Türkiye'deki durumu, etiyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi ve patolojisi, klinik bulguları, tanısı, tedavi-koruma ve kontrolü hakkında bilgi verilmiştir.

Ülkemizde söz konusu hastalığın ortaya çıkışı yeni sayılabilecek bir zaman diliminde gerçekleş-

miş olsa da dünyada varlığı bir asırdır bilinmektedir. Sığır sağlığı açısından oldukça önemli olan LSD ile ilgili geniş çaplı araştırmaların yapılması, teşhis kitlerinin ve teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi hem hayvan hem de insan sağlığının korunması açısından oldukça önemlidir.

LSD salgınları büyük oranda hayvanın bağışıklık durumuna, hayvan hareketlerine ve vektör popülasyonunu etkileyen rüzgâr ve yağış gibi iklimsel faktörlere bağlıdır. Hastalığın ortaya çıkışı ile acilen karantina tedbirlerinin alınması, hasta ve hastalıktan şüpheli hayvanların kesime gönderilmesi, dezenfeksiyon ve aşı uygulamaları yapılmalıdır.

## Kaynaklar

1. Abutarbush SM, Ababneh MM, Al Zoubi MG, Alekish MO, Al Gharabat RJ. (2013). Lumpy Skin Disease in Jordan, disease emergence, clinical signs, complications and preliminary-associated economic losses. *Transbound Emerg Dis.* 62 (5), 549-554.
2. Awad WS, Ibrahim AK, Mahran K, Fararh KM, Moniem MIA. (2010). Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of Lumpy skin disease in cows. *Trop Anim Health Prod.* 42(4), 777-783.
3. Babiuk S, Bowden TR, Boyle DB, Wallace DB, Kitching RP. (2008). Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transbound Emerg Dis.* 55, 263-272.
4. Babiuk S, Wallace DB, Smith SJ, Bowden TR, Dalman B, Copps GJ, Boyle DB. (2009). Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transbound Emerg Dis.* 56, 132-141.
5. Barut MF. (2015). Sığırların Nodüler Ekzantemi (Lumpy Skin Disease (LSD)) Hastalık Kartı. Erişim adresi: <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez/Belgeler/Lumpy%20Skin%20Disease%20LSD%20hastal%C4%B1k%20kart%C4%B1.pdf>, Erişim tarihi: 07.10.2019.
6. Body M, Singh KP, Hussain MH, Al-Rawahi A, Al-Maawali M, Al-Lamki K, Al-Habsy S. (2012). Clinico-histopathological findings and PCR based diagnosis of lumpy skin disease in the Sultanate of Oman. *Pak Vet J.* 32(2), 206-210.
7. Burdin ML. (1959). The use of histopathological examination of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya. *Bull Epizootic Dis of Africa,* 7,21-26.
8. Chihota CM, Rennie LF, Kitching RP, Mellor PS. (2001). Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol Infect.* 126, 317-321.
9. Chihota CM, Rennie LF, Kitching RP, Mellor PS. (2003). Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med Vet Entomol.* 17, 294-300.

10. Coetzer JAW. (2004) Lumpy skin disease. Coetzer JAW, Justin RCJ. eds. *Infectious Diseases of Livestock*. Second edition. Oxford University press, Cape Town. p.1268-1276
11. Davies FG. (1991). Lumpy skin disease, an African capripoxvirus disease of cattle. *Br Vet J*. 147(6), 489-503.
12. El-Kholy AA, Soliman HMT, Abdelrahman KA. (2008). Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of a recent lumpy skin disease virus incursion to Egypt. *Arab J Biotech*. 11, 293-302.
13. FAO. (2013). Emergence of lumpy skin disease in the Eastern Mediterranean Basin countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Regional Office for the Near East (FAO-RNE). *Empres Watch*, 29.
14. Gelaye E, Lamien CE, Silber R, Tuppurainen ESM, Grabherr R, Diallo A. (2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snap-back primer and dsDNA intercalating dye. *Plos one*. 8(10), e75971.
15. Gibbs P. (2005). Pox diseases. Kahn CM. eds. *The Merck Veterinary Manual*, Merck & Co Inc, New Jersey. p.699-700.
16. GKGM (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü) (2019). Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesi (2019/1). Yayımlanma tarihi: 29.03.2019. Erişim adresi: <https://kms.kaysis.gov.tr/Home/Goster/150753>, Erişim tarihi: 07.10.2019.
17. Gürçay M, Sait A, Parmaksız A, Kılıç A. (2015). Türkiye’de lumpy skin disease virus enfeksiyonunun klinik bulgular ve PCR yöntemi ile saptanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 21(3), 417-420.
18. Hailu B, Alemayehu G. (2015). Epidemiology, economic importance and control techniques of lumpy skin diseases: A review. *Int J Agric Res Rev*. 3, 197-205.
19. Heine HG, Stevens MP, Foord AJ, Boyle DB. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia Virus H3L gene. *J Immunol Methods*. 227, 187-196.
20. Ireland DC, Binopal YS. (1998) Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J Virol Methods*. 74(1), 1-7.
21. Irons PC, Tuppurainen ESM, Venter EH. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*. 63, 1290-1297.
22. Kara PD, Afonso CL, Wallace, DB, Kutish GF, Abolnik C, Lu Z, Vreede FT, Taljaard LCF, Zsak A, Vilojen GJ, Rock DL. (2003). Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of lumpy skin disease virus. *Arch Virol*. 148, 1335-1336.
23. Lamien CE, Lelenta M, Goger W, Silber R, Tuppurainen E, Matijevec M, Luckins AG, Diallo A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses, *J Virol Methods*. 171(1), 134-140.
24. Le Goff C, Fakhfakh E, Chadeyras A, Aba Adulugba E, Libeau G, Hammami S, Diallo A, Albina E. (2005). Host-range phylo genetic grouping of capripoxviruses: genotyping of CaPVs. Makkar HPS, Viljoen GJ. eds. *Applications of Gene-Based Technologies for improving Animal Production and Health in Developing Countries*. Springer, Berlin. p.727-733.
25. Lubinga JC, Clift SJ, Tuppurainen ES, Stoltz WH, Babiuk S, Coetzer JA, Venter EH. (2014a). Demonstration of lumpy skin disease virus infection in *Amblyomma hebraeum* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using immunohistochemistry. *Ticks Tick Borne Dis*. 5(2), 113-120.
26. Lubinga JC, Tuppurainen ES, Coetzer JA, Stoltz WH, Venter EH, (2014b). Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. *Exp Appl Acarol*. 62(1), 67-75.
27. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzineck MC, Studdert MJ. (1999). Poxviridae. *Veterinary Virology*. Third edition, Academic Press. New York. p.277-293.
28. OIE. (2019a). Lumpy skin disease: current situation in Europe and neighbouring regions and necessary control measures to halt the spread in South-East Europe. Erişim adresi: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications\\_&\\_Documentation/docs/pdf/TT/2016\\_EUR2\\_Tuppurainen\\_A.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_&_Documentation/docs/pdf/TT/2016_EUR2_Tuppurainen_A.pdf), Erişim tarihi: 07.10.2019a.
29. OIE. (2019b). Lumpy skin disease. Erişim adresi: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/LUMPY\\_SKIN\\_DISEASE\\_FINAL.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/LUMPY_SKIN_DISEASE_FINAL.pdf), Erişim tarihi: 07.10.2019b.
30. OIE. (2019c). LSD – A good example of international coordination in combatting an emerging exotic vector borne disease. One Health for the Mediterranean Region in the Age of Big Data Cagliari, Sardinia, Italy, 30 September - 2 October 2019. Erişim adresi: [https://www.oie.int/onehealthconference2019/wp-content/uploads/2019/10/16\\_DeClerq\\_LSD\\_Goodexample\\_coordination\\_combat\\_emergingzoonotic\\_vectorbornedisease.pdf](https://www.oie.int/onehealthconference2019/wp-content/uploads/2019/10/16_DeClerq_LSD_Goodexample_coordination_combat_emergingzoonotic_vectorbornedisease.pdf), Erişim tarihi: 18.11.2019c.
31. OIE. Terrestrial Manual. (2017). Lumpy Skin Disease. Chapter 2.4.13. Erişim adresi: [https://test.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.13\\_LSD.pdf](https://test.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_LSD.pdf), Erişim tarihi: 07.10.2019.
32. Özgünlük İ, Yumuşak N, Ün H, Yılmaz R, Çabalar M. (2014). Lumpy Skin Disease (LSD) Olgusunun Moleküler ve Histopatolojik Tanısı. XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Bildiri Kitabı, Kemer-Antalya, p.80.
33. Radostits O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007). A textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goat. *Veterinary Medicine*. Saunders W.B. (Ed.) 10<sup>th</sup> Co., Philadelphia, USA.
34. Salib FA, Osman AH. (2011). Incidence of lumpy skin disease among Egyptian cattle in Giza Governorate. *Egypt Vet World*. 4, 162-167.
35. Saraç F. (2019). GF-TADs. Global framework for the progressive control of transboundary animal diseases. Standing Group of Experts on Lumpy Skin Disease in South East Europe under the GF TADs umbrella, SGE LSD9, Athens, 16-17 October 2019, Report for Turkey. Erişim adresi: <https://web.oie.int/RR-Europe/eng/Regprog/docs/docs/LSD9/>

- LSD%20presentations/TR\_LSD\_PPT\_SGE\_LSD9.pdf, Erişim tarihi: 18.11.2019.
36. Sharawi SS, Abd El-Rahim IH. (2011). The utility of polymerase chain reaction for diagnosis of lumpy skin disease in cattle and water buffaloes in Egypt. *Rev Sci Tech OffInt Epizoot.* 30, 821-830.
  37. Stram Y, Kuznetzova L, Friedgut O, Gelman B, Yadin H, Rubinstein-Guini M. (2008). The use of lumpy skin disease virus genome termini for detection and phylogenetic analysis. *J Virol Methods.* 151(2), 225-229.
  38. Tageldin MH, Wallace DB, Gerdes GH, Putterill JF, Greyling RR, Phosiwa MN, Al Busaidy RM, Al Ismaaily SI. (2014). Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman. *Trop Anim Health Pro.* 46(1), 241-246.
  39. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *J Virol.* 75(15), 7122-7130.
  40. Tuppurainen ES, Venter EH, Coetzer JA. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different techniques. *Onderstepoort J Vet.* 72, 153-164.
  41. Tuppurainen ES, Stoltz WH, Troskie M, Wallace DB, Oura CA, Mellor PS, Coetzer JA, Venter EH. (2011). A potential role for ixodid (hard) tick vectors in the transmission of lumpy skin disease virus in cattle. *Transbound Emerg Dis.* 58, 93-104.
  42. Uyar A, Yener Z, Yıldırım S, Keleş ÖF. (2015). Holştayn bir inekte lumpy skin disease (noduler ekzantem) olgusu. *FÜ Sağ Bil Vet Derg.* 29 (1), 49-53.
  43. Vorster JH, Mapham PH. (2008). Pathology of lumpy skin disease. *Livest Hilth Prod Rev.* 1, 16-21.
  44. Zhou T, Jia H, Chen G, He X, Fang Y, Wang X, Guan Q, Zeng S, Cui Q, Jing Z. (2012). Phylogenetic analysis of Chinese sheep pox and goat pox virus isolates. *Virology J.* 9, 25.