

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 31 ♦ Sayı/Issue 1 ♦ 2020

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Cilt/Volume 31 ♦ Sayı/Issue 1 ♦ 2020

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. 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

İnternet adresi :

<https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez>
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd>

* İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir
Names are listed alphabetically by surname

Hakem Listesi* / Reviewer List

Prof.Dr. Zahid Tevfik AĞAOĞLU
 Dr. Öğr. Üyesi Eray ALÇIĞIR
 Asoc.Prof. Saevan Saad AL-MAHMOOD
 Doç.Dr. Şinasi AŞKAR
 Dr. Zafer ATA
 Prof.Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU
 Prof.Dr. Oya BULUT
 Doç.Dr. Özgür Yaşar ÇELİK
 Doç.Dr. Songül ÇERİBAŞI
 Doç.Dr. Menekşe Didem DEMİRCAN
 Prof.Dr. Gül Bahar ERDEM
 Dr. Öğr. Üyesi Ufuk EROL
 Dr. Ali ERKURT
 Yük. Su Ürünleri Müh. Nurdan FİLİK
 Dr. Burak GÜNGÖR
 Prof.Dr. Mustafa HASÖKSÜZ
 Doç.Dr. Zeynep KARAPINAR
 Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU
 Doç.Dr. Beytullah KENAR
 Dr. Öğr. Üyesi Tahsin Onur KEVENK
 Doç.Dr. Demet KOCATEPE
 Dr. Bahattin Taylan KOÇ
 Doç.Dr. Aslı KORKMAZ
 Yük. Kimya Müh. Azime MERCAN
 Doç.Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK
 Prof.Dr. Ertan ORUÇ
 Doç.Dr. Mustafa ÖZKARACA
 Dr. Hazal ÖZTÜRK GÜRGEN
 Dr. Ahmet SAİT
 Dr. Fahriye SARAÇ
 Dr. Öğr.Üyesi Neslihan SÜRSAL
 Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK
 Dr. Öğr. Üyesi A. Ezgi TELLİ
 Doç.Dr. Burhan TOPRAK
 Prof.Dr. Hikmet ÜN
 Dr. Öğr. Üyesi Özlem Şahan YAPICIER
 Prof.Dr. Yeliz YILDIRIM
 Dr. Gülay YÜZBAŞIOĞLU ÖZTÜRK

Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları AD.
 Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
 Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, Univ. of Mosul, Iraq
 Çankırı Karatekin Üniv. Sağlık Bilimleri Fak. Beslenme ve Diyetetik Bölümü
 Kara Kuvvetleri Komutanlığı Askeri Veteriner Okulu ve Eğt. Mrk. K.İği
 Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Histoloji AD.
 Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Siirt Üniv. Veteriner Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü İç Hast. AD.
 Fırat Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
 İstanbul Üniv. Su Bil. Fak. Su Ürünleri Yetişt. ve Hast. Böl. Su Ürünleri Hast. AD.
 Yıldırım Beyazıt Üniv. Eğitim ve Araştırma Hastanesi
 Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
 Veteriner Kontrol Merkez Araşt. Enst. Müd. Biyokimya Lab.
 Süleyman Demirel Üniv. Su Ürünleri Müh. Bölümü
 Veteriner Kontrol Merkez Araşt. Enst. Müd. Antraks Aşı Üretim Lab.
 İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Balıkesir Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Afyon Kocatepe Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
 Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni AD.
 Sinop Üniv. Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Yetiştiriciliği AD.
 Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı
 Veteriner Kontrol Merkez Araşt. Enst. Müd. Toksikoloji Lab.
 Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
 Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
 Atatürk Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
 İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
 Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Virolojik Teşhis Lab.
 Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müd. Virolojik Teşhis Lab.
 Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
 Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni AD.
 Veteriner Kontrol Merkez Araşt. Enst. Müd. Genetik Lab.
 Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
 Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
 Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni AD.
 İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi 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 Atıf Dizini, CAB Abstracts, Asos Index veritabanları kapsamında bulunan DergiPark'da açık erişim olarak yayın yapan, "en az çift hakemli" bir dergidir.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is an open access journal, that evaluated by at least two double-blind reviewers and indexing in the scope of ULAKBİM life sciences, Turkish citation index, CAB abstracts and publishes scientific articles open access on DergiPark databases and.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2020, Her hakkı saklıdır. / All rights reserved.
 Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2020, 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

Original Article / Özgün Araştırma

Serological evaluation of precolostral Bovine Parainfluenza 3 Virus infection in an organised dairy herd

Bir organize sütçü işletmede Bovine Parainfluenza 3 Virus enfeksiyonunun prekolostroal olarak serolojik değerlendirmesi

Sibel Gür, Ayşe Gencay Göksu, Fatih Mehmet Birdane 1

Determination of the effects of Enrofloxacin, Linco-Spectin and Florfenicol Antibiotics on BHK-21 cell culture and FMD 146S virus particles-infective titers

Enrofloxacin, Linco-Spectin ve Florfenicol antibiyotiklerinin BHK-21 hücre kültürü ve FMD 146S virus partikülü-infektif titreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

Banu Bayri Özbilge, Veli Gülyaz, Neslihan Taşçene, Şükran Yılmaz, Yasemin Gültekin, Ayşenur Ulusoy, Mustafa Hasöksüz, Gonca Öztap 7

Gıda ve yem mikrobiyoloji laboratuvarlarında seçilmiş riskler ile risk kaynaklarına ilişkin kontrol mekanizmaları

Control mechanisms about selection risk with risk resources in the food and feed microbiology laboratories

Nuray Gamze Yörük, Erdem Danyer 20

Balıklardan izole edilen bakteriyel etkenler: Beş yıllık değerlendirme

Bacterial agents isolated from fish: A five year evaluation

Zeynep Şık, Özlem Altıntaş, Enes Gazi Atıcı 29

Bingöl'de yetiştirilen sığır sürülerinde Bovine Viral Diyare Virüs enfeksiyonunun varlığının ve yaygınlığının belirlenmesi

Determination of presence and prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus infection in cattle herds in Bingöl province

Metin Gürçay, Hakan Keçeci, Merve Öztürk 34

Van yöresinde koyun klinik mastitis olgularından izole edilen bakteri türlerinin prevalansı ve antimikrobiyel duyarlılıkları

Prevalance and antimicrobial susceptibility of bacterial species isolated from ovine clinical mastitis cases in Van province

Mehmet Salih Sercan Gökhan, Özgül Gülaydın 39

Investigation of Nasal *Staphylococcus aureus* carriage in hospital employees and rapid detection of PVL and *mecA* genes by RT-PCR

Hastane çalışanlarında Nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve PVL ile *mecA* genlerinin RT-PCR ile hızlı tespiti

Dilek Dülger, Seda Ekici, Özgür Albuz, Ahu Pakdemirli 47

Sığırlarda farklı pnömoni tiplerinde Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF α), Malondialdehit (MDA), Prokalsitonin ve Neopterin düzeylerinin karşılaştırılması

Comparison of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α), Malondialdehyde (MDA), Procalcitonin and Neopterin levels in Different pneumonia types in cattle

Nevin Tuzcu, Mehmet Tuzcu, Gökhan Akçakavak 52

Adaptation of Contagious ecthyma vaccine strain to MDBK cell culture and stability-immunity studies in lambs

Ecthyma contagiosa karşı MDBK hücre kültüründe aşı üretimi ve bağışıklık-stabilite çalışmaları

Veli Gülyaz, Fahriye Saraç, Esra Satır, Serdar Uzar, Eray Atıl 62

Türkiye'nin Muğla ili Datça ilçesinde sahipli köpeklerde pire enfestasyonları

Flea infestations on owned dogs in Datça district Muğla province of Turkey

Mehmet Acıöz, Mehmet Fatih Aydın 70

The use of rabbits in studies of immunity and safety of Contagious Ecthyma (CE) vaccine

Contagious Ektima (CE) aşısının bağışıklık ve zararsızlık çalışmalarında tavşanların kullanılması

Veli Gülyaz, Fahriye Saraç, Mustafa Hasöksüz, Serdar Uzar 75

Case Report / Olgu Sunumu

Malignant Catarrhal Fever caused by Ovine Herpesvirus-2 in a cow

Bir inekte Ovine Herpesvirüs-2'nin neden olduğu Sığır Gangrenli Nezlesi olgusu

Hamdi Avcı, Emrah İpek, Ali Rıza Babaoğlu, Erkmen Tuğrul Epikmen, Ahmet Aydoğan 82

Review Article / Derleme

Taze tavuk etlerinde aktif ambalajlama uygulamaları

Active packaging applications in fresh chicken meat

Özge Özer, Farnaz Naserifar, Özlem Kızılırmak Esmer 87

Kanatlı hayvanlarda mukozal bağışıklık

Mucosal immunity in poultry

Zeynep Şık 93

Yeterli ve sağlıklı gıda temininde Veteriner Hekimliğin önemi ve Veteriner Kontrol Araştırma Enstitülerinin rolü

The role of Veterinary Medicine and Veterinary Control Research Institutes in the food security and supply chains

Özcan Yıldırım, Cevdet Yaralı, Erdem Danyer 101

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım 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. Yazılmanın tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, olgu sunumlarında ve kısa bildirilerde 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 bildiriler, 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 zorunludur. 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^{1,a,*}

¹Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Genetik Laboratuvarı, 06020, Ankara, Türkiye

^aORCID: 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: kısmı 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 metini:

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 bildirilerde 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 geçmişi 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, istatistiksel yöntem, Deney deseni vb.)

15. **Bulgular,** bölümünde veriler, tekrarlama 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 araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılması 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, yayının tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde ibare koyularak belirtilmelidir.

19. Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelı 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 Willey and Sons, p.103.

Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, 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 digenetic trematoda from the Alosa fallax in Turkey. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, Izmir-Turkey.

Tezler:

Aksoy E. (1997). Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immüno-peroksidaz 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.ias-tate.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 "x" 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 ETVC 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, Hakemleme, 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. Etlik 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 ku-

ruldan 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 çerçevesince 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 yayının 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.

Etlik 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 yazılarının basılması karşılığında herhangi bir ödeme yapılmaz. Yayınlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez. Gönderilen makalelere ilişkin itirazda veya şikâyetle 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 Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi,

1977-1986 yılları arasında Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi,

1987 yılından günümüze kadar Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi adıyla yayınlanmıştır.

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 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^{1,a,*}

¹Veterinary Control Central Research Institute, Laboratory of Genetics, 06020, Ankara, Turkey

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolyalı 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 relevant 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 "x".

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:



Serological evaluation of precolostral Bovine Parainfluenza 3 Virus infection in an organised dairy herd*

Sibel Gür¹, Ayşe Gencay Göksu², Fatih Mehmet Birdane³

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Afyonkarahisar, Turkey.

²Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Kayseri, Turkey.

³Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Afyonkarahisar, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 08.10.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 05.05.2020

Abstract: Calves are born agammaglobulinemic due to syndesmochorial placenta features that prevent immunoglobulin transfer to the fetus from the dam. The presence of precolostral antibody (Ab) directly induces in-utero infection. The purpose of this study was to investigate Bovine Parainfluenza 3 virus (BPI3V) infection in precolostral calves and their dams. Samples were obtained from large-scale dairy cattle farm, which was established nearly 10 years ago. Blood serum samples were collected immediately after birth from precolostral calves (n=123) and their dams for about three-month period. Blood serum samples tested with Serum Neutralisation test using reference strain SF-4. BPI3V specific Ab was found in 119 of 123 dams (96.7%), and Ab titers showed a regular bell curve distribution's and peak points were at 1/20 and 1/40 interval. Out of all precolostral calves, 31 (25.2%) were Ab positive between 1/5 and 1/80 titer values. Average Ab titer level was higher in the dams of Ab positive calves as expected a result of recent infection history. The obtained data revealed that almost all the adults were exposed to BPI3V and one of the four pregnant had transplacental infections. Current veterinary practices are based on the prevention of diseases, which is an important point for intensive dairy breeding enterprises. Precolostral Ab controls can be used as a convenient tool for estimating and eliminating the risks of upcoming postpartum infections.

Key words: Bovine Parainfluenza Virus 3, Cattle, Precolostral, Serocontrol.

Bir organize sütçü işletmede Bovine Parainfluenza 3 Virus enfeksiyonunun prekoloztral olarak serolojik değerlendirmesi

Özet: Buzağılar anneden yavruya immunoglobulin geçişini önleyen syndesmochorial plasenta yapısı nedeniyle agammaglobulinemik olarak doğarlar. Prekoloztral antikor varlığı direkt olarak in-utero enfeksiyonu gösterir. Bu çalışmada prekoloztral buzağılar ve annelerinde Bovine Parainfluenza 3 virus (BPI3V) enfeksiyonunu araştırmak amaçlanmıştır. Örnekler yaklaşık on yıl önce kurulmuş büyük ölçekli bir çiftlikten elde edildi. Kan serum örnekleri yaklaşık 3 ay süresince, doğumdan hemen sonra prekoloztral buzağılardan (n=123) ve annelerinden alındı. Kan serum örnekleri referans suş SF-4 kullanılarak yapılan Serum Nötralizasyon ile test edildi. BPI3V spesifik antikorlar 123 annenin 119'unda (%96.7) tespit edildi ve antikor titrelerinin düzenli çan eğrisi gösterdiği ve 1/20 ile 1/40 aralığında pik yaptığı belirlendi. Prekoloztral buzağının ise 31'inde (%25.2) 1/5 ile 1/80 aralığında antikor titreleri belirlendi. Antikor pozitif buzağının annelerinde ise beklediği gibi yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyona bağlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Elde edilen verilere göre neredeyse tüm ineklerin BPI3V'a maruz kaldığı ve her dört gebe ineğin birinin transplasental enfeksiyon geçirdiği anlaşıldı. Geçerli Veteriner uygulamalarının temeli, özellikle sütçü intensif yetiştiricilik açısından önemli olan koruyucu hekimliğe dayanır. Prekoloztral antikor kontrolleri yakın gelecekte karışılabilir postpartum enfeksiyon risklerini tahmin ve elimine etmek için kullanılabilir yararlı bir yöntemdir.

Anahtar kelimeler: Bovine Parainfluenza Virus 3, Prekoloztral, Serokontrol, Sığır.

Introduction

The duration of viremia is mainly concerned with the formation of specific antibodies (Abs) in all species. The embryo or fetus is usually not affected by infections if the dam has a protective Abs level in the blood. However, even a short period of vire-

mia can result in an intrauterine infection in some cases. Clinical findings of prenatal infections may vary depending on the type of infectious agent and virulence. Syndesmochorial placenta features in the ruminants form a syncytium between the endometrium and the fetal trophoblast. These structures

*Bu çalışma daha önce Uluslararası bir kongrede sunulmuştur;

Gür, S., Gencay, A., Birdane, F.M., (2017). Precolostral detection of Bovine Parainfluenza 3 Virus infection in a dairy herd. 7th Veterinary Congress, p. 29, September, 3-4, Paris, France. (Oral Presentation)

Yazışma adresi / Correspondence: Sibel Gür, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji AD, Afyonkarahisar
E-posta: sibelgr@yahoo.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-8915-5409 • ²0000-0003-4422-8085 • ³0000-0003-0026-800X

create a barrier between maternal and fetal blood resources. As a result, no immunoglobulin can pass from the uterus to the fetus (Arthur 1996).

Ruminant embryos are completely defenceless to infections at the first trimester of pregnancy. Lytic type viral infections can cause death of the embryo. The outcome of infections that occur during the 90-110 days of gestation at the time of development of the immune system may vary (Kendrick 1971). Virulence of the agent is the main determinant in this stage. Possible consequences include; abortion, intrauterine growth retardation, premature birth, stillbirth, congenital anomalies and symptomatic or asymptomatic infection. So far, few viral, bacterial and parasitic infections have been studied in the precolostral phase (Bosch et al. 2000; Staubli et al. 2006; Schefers et al. 2008; Ozel and Gur 2015). The only bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection has been well researched in this respect due to its complicated pathogenesis (Kendrick 1971; Schefers et al. 2008).

Bovine Parainfluenza-3 Virus (BPI3V) infection in cattle is associated with respiratory system disorders. The virus was first isolated in the USA (Reisinger 1959). Later, it was proved that the disease spread worldwide (Figueroa-Chavez et al. 2012). The agent is classified as *Paramyxovirus* of *Respirovirus* genus in the family *Paramyxoviridae* (Rima et al. 2019). Primer entry site is the upper respiratory mucosa. Proliferation of the virus preferably occurs in ciliated cells (Zhang et al. 2005). Fever, depression, cough, serous nasal and ocular discharge, anorexia, dyspnea, increased rate of respiration and breathing sounds are the main clinical signs (Bryson et al. 1989). Another name of the infection is shipping fever, since the immunosuppression caused by animal transport often results in activation of the virus. Fulton et al. (2000) detected 68% seroconversion after transportation of the calves, and detected antigen in 7 of 9 lung tissues. Experimental inoculations result in atelectasis, consolidation in the cranio-ventral aspects of the lungs, interlobular edema, bronchial/bronchiolar epithelial cell necrosis, syncytium formation, bronchial-alveolar epithelial cell hyperplasia and bronchiolitis obliterans (Tsai and Thomson 1975; Bryson et al. 1999).

BPI3 mostly occurred during the months from October to March (Stott et al. 1980). The mortality rate is very low, but can reach up to 10% in severe cases, and persistent pulmonary damage may remain in survivors (Thomas et al. 1978). BPI3 infection has been shown to lead to dysfunction of alveolar macrophages, which play an important role in

bacterial opsonization (Brown and Ananaba, 1988). The most important aspect of BPI3V is to serve as an initiator to the development of secondary bacterial pneumonitis. The agent is one of the main factors of the bovine respiratory disease complex (BRD). BPI3 infection usually lasts with subclinically or mild disorders (Hodgins et al. 2002), if not complicated by other infectious agents. Severe cases have been reported in the presence of internal or external immunosuppressive factors (Snowder et al. 2006). Due to difficulties in the differential diagnosis of BRD, laboratory controls are a necessity in defining and challenging this economically important problem. Infection prevention studies are an important part of herd management. When an acute infection begins, viral antigen diagnosis cannot always be done quickly and accurately in field conditions. Antibody screening in adults will not be supply efficient data in order to make definitive assessments. We hypothesize that, sera-controls of precolostral calves may be a useful method to identify the recently circulating agents and to understand the actual contagious infection profile of the herd. These studies have been done for only a few infections.

The aim of this study is to assess the BPI3V infection in a closed system dairy breeding herd through serological controls of precolostral calves and their dams at the same time.

Materials and Methods

Materials

Sampled animals

In this study, samples were taken from a dairy cattle enterprise which was established nearly ten years ago in the Afyonkarahisar province, Central Anatolia. More than 1.500 animals in different age groups are breeding in a closed system intensive breeding management. The number of fertile cows was roughly 1.100. Immediately after birth, blood samples were taken simultaneously from the offspring (n=123) in the precolostral period, and simultaneously from their dams, over a period of nearly three months.

All the sampled animals were clinically normal during sampling. According to the farm's health records; Foot and Mouth Disease, *E. coli*, Rotavirus and Coronavirus vaccines were administered in the last two years before sampling. Except these infections, no any vaccination has been carried out for BPI3V or other prominent infections like BHV1 and BVDV.

It has been reported that no new animals have been taken to the farm since the day it was founded.

As learned from the farm records and veterinarians, the major health problems in the herd are diarrhea and pneumonia in calves, various reproductive problems and mastitis problem in cows have been increased especially in the last year. Blood samples were taken via vein-puncture from the jugular vein into Vacutainer tubes and transferred to the laboratory in cool chain, centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Serum fractions were separated into stock tubes and stored at -20°C until the tests.

Cell culture

Madine Darby bovine kidney (MDBK) cell culture (ATCC, CCL-22) was used for virus propagation, titration and virus neutralization test. Cells were cultured in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) supplemented with 2-10% fetal calf serum (FCS).

Test virüs

BPI3V reference strain SF-4 ($10^{-3.7}$ TCID₅₀/0,1ml) kindly provided by Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology was used as a test virus. Tissue culture infective dose 50% (TCID₅₀) of the virus suspension was calculated by Spearman and Karber method (Osterkorn 1982).

Methods

Serum Neutralisation test

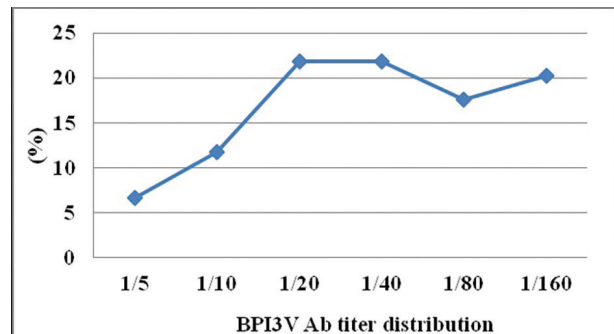
For the detection of BPI3V specific antibody presence, micro serum neutralisation test was carried out (Frey and Liess 1971). For this purpose, the blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Sera were separated, inactivated at 56 °C for 30 min and kept at -20 °C until analysis. Initially, all serum samples were diluted 1/5 with cell culture medium. Later on, 50 µl of the dilution was placed into two wells of the 96 well tissue culture plates with the same volume of virus suspension containing approximately 100 TCID₅₀ per 50 µl. After 1h of incubation, 50 µl cell suspensions (300.000 cells/ml) were added and incubated at 37 °C with 5% CO₂ conditions for one day. Test results were determined based on micromorphology of cells using an inverted microscope in subsequent two days.

All the Ab positive serum samples were diluted into 1/5, 1/10...1/160 rates and re-tested to determine the Ab titer values.

Results

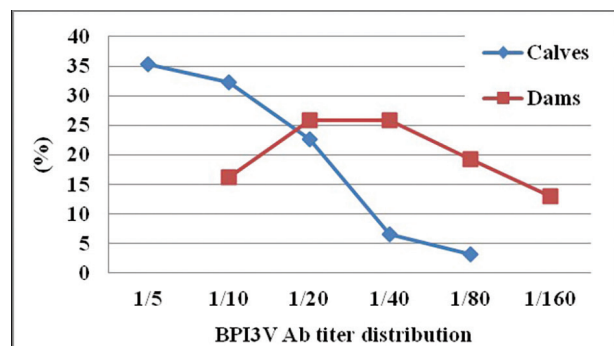
According to the test results, 1/5 dilution and above was accepted as seropositive. BPI3V specific Abs was found to be 119 of 123 dams (96.7%). As can be seen in figure 1, regular bell curve distribution's peak point was 1/20 and 1/40 interval. A slight increase was observed from 1/80 dilution point.

Figure 1. BPI3V Ab titer distribution of all dams



Out of their precolostral calves, 31 (25.2%) was Ab positive between 1/5 and 1/80 titer values. Positive calves and their dam's Ab titer values are shown in Figure 2.

Figure 2. BPI3V Ab titer distribution of precolostral calves and their dams



Discussion

BPI3V has worldwide spread (Frank 1992; Fulton 2009a). The infection was reported for the first time at 1971 in Turkey, 96% and 100% seropositivity detected in two cattle herds (Erhan et al. 1971). Subsequently, many studies were conducted from different regions across the country. Total negativity has not been reported in any study so far. In serological studies conducted in different parts of the country, these rates were reported; %50.63 in Central Anatolia (Ozturk and Yavru 1988), 88.2% in East and Southern East Anatolia (Cabalar and Can-Sahna 2000), 43% in Marmara (Yesilbag and Gungor 2008),

38.2% in West Anatolia (Erol et al. 2007), 52.7% in nine provinces all over the Turkey (Alkan et al. 1997).

BPI3V was serologically investigated in small scale private cattle herds throughout the Afyonkarahisar province recently. The seropositivity rate ranges from 58.8% to 97.5%, with a total of 1.279, 1.058 (82.7%) cattle exposed to the virus under field conditions (Gur 2018).

Considering the absence of vaccination for the BPI3V and no new animal introduction since the establishment, it was assessed that obtained data reflect natural infection (96.7%). This rate is extremely high even for an organized enterprise. However, the detection of high infection prevalence in the small private herds (82.7%) in the same localisation shortly before, makes reasonable of the obtained value (Gur 2018). The presence of low-level Abs in the majority of adults indicates previous exposure. However, an increase after 1/80 dilution reveals recent acute infection in a limited number of dams (Fig. 1). Precolostral serocontrols showed that 31 of 123 (25.2%) calves were exposed to the virus in-utero in the last five months of gestation. Precolostral Ab levels started at 1/5 and decreased rapidly to 1/40. Surprisingly, it was found to be in a high Ab titer (1/80) in a calf. Dams of positive calves generally have higher levels of Abs compared to other cows, as a result of recent infection, as expected (Fig. 2). According to test results, it would not be wrong to say that the virus is in circulation in the herd. In addition, the presence of Abs in almost all animals even at different levels, explains the absence of clinical disorders in both dams and in other offsprings fed from milk tank.

Passively induced immunity is assumed to be protected until 3 to 6 months of age (Kirkpatrick et al. 2001). In fact, the duration of maternal deprived protection is directly related to the level of antibodies taken from the colostrum and milk. It cannot be said that the maternal antibodies completely prevent the natural infection, but it is known to reduce the severity of the disease. Initial exposure to the virus may cause clinical disease, but subsequent exposures are subclinical because of the presence of secretory IgG in the blood serum for approximately one year. In addition, the presence of IgA in respiratory mucosal secretions provides protection from re-infections for about 2 months (Graham et al. 1999).

Bovine respiratory disease (BRD) has a global spread. Impaired phagocytic activity of alveolar macrophages during acute BPI3 infection (Lig-

gitt et al. 1985, Slauson et al. 1987), and decrease in surfactant production due to viral replication in the alveolar type II cells (Tsai and Thomson 1975) are facilitates the development of seconder bacterial infection. BPI3V plays a significant role in this complex problem among many other viral and bacterial microorganisms. Besides BPI3V, well-known etiologic agents in cattle: *Bovine Herpesvirus type 1* (BHV1), *Bovine Respiratory Coronavirus* (BRCV), *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV), *Bovine Respiratory Syncytial Virus* (BRSV), *Bovine Adenovirus* (BAV), *Mycoplasmas*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somnus*, *Mycoplasma bovis* and *Bibersteinia trehalosi* (Fulton et al. 2009b; Jericho et al. 1982; Griffin et al. 2010; Panciera and Confer 2010). Ghram et al. (1989) reported that prognosis is heavier in the dual BHV1 and PI3 infections.

Severity of BRD prognosis was determined by environmental factors, virus, bacteria and host interaction (Taylor et al. 2010). There are many different ways to fight infections. The strategy will be chosen depending on the agent characteristics and its pathogenetic pathway. In the meantime, the identification of infections in the current circulation has priority. Like BRD, it is difficult to distinguish many viruses that affect the alimentary and the genital system due to lack of any pathognomonic or specific clinical signs (Hodgins et al. 2002; Snowden et al. 2006; Murray et al. 2018). Precolostral controls may be preferred for the discriminate the etiological agents which carry true risk potential for the herd. It should be considered that, the presence of stress factors such as transport, seasonal change, malnutrition, heat imbalance, weaning, parasitism, hormonal fluctuations, etc. determines the clinical picture and mortality of BPI3V infection (Maillard et al. 2006; Snowden et al. 2006).

Morbidity tends to be quite high during outbreaks. Under normal conditions, it can be said that BPI3V is part of the respiratory tract flora considering viral shedding from asymptomatic animals and the emergence soon after transports (Hodgins et al. 2002; Murray et al. 2018). In an experimental study, Tsai and Thomson (1975) were demonstrated that the virus budding through the basal alveolar membrane and the presence of virus particles in the interstitial tissue, besides they detected the virions in the subepithelial area, suggested that persistent infection may develop in some hosts. It is understood that viral shedding may continue after acute infection. In addition, it was stated in the same study that the infection was seen without observable clinical signs in some calves.

There are many therapeutic options for bacterial infections but not for viral ones. As virulence and pathogenetic pathways of virus families are different from each other, distinct methods need to be used while applying control and eradication strategies. At this point, an exact definition of the causative agent is crucial. Viral diagnosis under field conditions can be cumbersome and requires great attention. Incorrect results are always possible during long processing. During pregnancy, especially in the last trimester, many viral agents including BPIV3 can cross the placenta and cause the formation of immunoglobulin. The data that can be obtained from Ab presence and level controls in random samples will only provide rough estimates in adults. On the other hand, precolostral Ab controls are easy and reliable method and directly reveals the infections that occurred at the last five months of the gestation.

Holistic view of sustainable herd management is the backbone of intensive dairy enterprises, especially in countries that have a high presence of the infections with major veterinary importance. The absence of therapeutic options in viral infections makes it necessary to know currently circulated viruses. At this point, procolostral sero-controls could be recommended due to its high potential on the determining successful vaccination schedule.

References

- Alkan F, Ozkul A, Karaoglu MT, Bilge S, Akca Y, Burgu I, Yesilbag K, Oguzoğlu TC. (1997). Sigirlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 44, 73-80.
- Arthur GH. (1996). The development of the conceptus. Arthur GH, Nokes DE, Pearson H, Parkinson TJ. eds. *Pregnancy and parturition in Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Seventh edition. WB Saunders, Philadelphia, USA. p.51-109.
- Bosch JC, Van Lieshout JA, De Wit JJ, Graat EA, Somers MJ. (2000). The serological BHV1 status of dams determines the precolostral status of their calves. *Vet Q.* 22, 99-102.
- Brown TT, Ananaba G. (1988). Effect of respiratory infections caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions. *Am J Vet Res.* 49, 1447-1451.
- Bryson DG, Adair BM, McNulty MS, McAliskey M, Bradford HE, Allan GM, Evans RT, Forster F. (1999). Studies on the efficacy of intranasal vaccination for prevention of experimentally induced parainfluenza type 3 virus pneumonia in calves. *Vet Rec.* 145, 33-39.
- Bryson DG, McNulty MS, Evans RT, Allan GM. (1989). Studies on the effect of recombinant human alpha-1 interferon on experimental parainfluenza type-3 infections of the bovine respiratory tract. *Vet Rec.* 125, 615-617.
- Cabalar M, Can-Sahna K. (2000). Dogu ve Guneydogu Anadolu Bolgesinde sut sigirlarinda Parainfluenza virus-3, Bovine Herpes Virus-1 ve Respiratory Syncytial Virus enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *Van Vet J.* 11, 101-105.
- Erhan M, Onar B, Csontos L, Hopkins IG. (1971). Koyun, sığır ve atların bazı virüsü ve Bedzonya hastalıkları üzerinde serolojik çalışmalar. *Pendik Vet Kont Aras Enst Derg.* 2, 51-58.
- Erol N, Gur S, Yildirim Y, Tan MT. (2007). A serological investigation on Parainfluenza-3 (PI-3) and Bovine Adenovirus (BAV) infections in Dairy Cow Enterprises in Aydın province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 13, 43-47.
- Figuroa-Chavez D, Segura-Correa JC, Garcia-Marquez LJ, Pescador-Rubio A, Valdivia-Flores AG. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 44, 1417-1421.
- Frank GH. (1992). Parainfluenza-3. Reinhardt RW. eds. *Veterinary Diagnostic Virology*. Mosby-Year Book Inc, USA. p.114-116.
- Frey HR, Liess B. (1971): Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralbl Vet Med.* 18, 61-71.
- Fulton RW. (2009)a. Bovine Respiratory disease research (1983-2009). *Anim Health Res Rev.* 10, 131-139.
- Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LT, Welsh RD, Johnson BJ, Reck A. (2009)b. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 464-477.
- Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, Burge LJ. (2000). Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res.* 64, 151-159.
- Ghram A, Reddy PG, Morrill JL, Blecha F, Minocha HC. (1989). Bovine herpesvirus-1 and parainfluenza-3 interactions: clinical and immunological response in calves. *Can J Vet Res.* 53, 62-67.
- Graham DA, Mawhinney KA, German A, Foster JC, Adair BM, Merza M. (1999). Isotype- and subclass-specific responses to infection and reinfection with parainfluenza-3 virus: comparison of the diagnostic potential of ELISAs detecting seroconversion and specific IgM and IgA. *J Vet Diagn Invest.* 11, 127-133.
- Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. (2010). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 26, 381-394.
- Gur S. (2018). An Investigation of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) and Bovine Parainfluenza Type 3 Virus (BPI3V) Infections in Small-Scale Cattle Herds in Afyonkarahisar Province. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg.* 29, 51-56.
- Hodgins DC, Conlon JA, Shewen PE. (2002). Respiratory Viruses and Bacteria in Cattle. Brogden KA, Guthmiller JM, eds. *Polymicrobial Diseases*. Washington DC, ASM Press. p. 213-230.
- Jericho KWF, Darcel C. le Q, Langford EV. (1982). Respiratory Disease in Calves Produced with Aerosols of Parainfluenza-3 Virus and *Pasteurella haemolytica*. *Can J Comp Med.* 46, 293-301.
- Kendrick JW. (1971). Bovine Viral Diarrhoea - Mucosal Disease virus infection in pregnant cows. *Am J Vet Res.* 35, 589-591.
- Kirkpatrick J, Fulton RW, Burge LJ, Dubois WR, Payton M. (2001). Passively transferred immunity in newborn calves,

- rate of antibody decay, and effect on subsequent vaccination with modified live virus vaccine. *Bov Practitioner*. 35, 47-54.
24. Liggitt D, Huston L, Silflow R, Evermann J, Trigo E. (1985). Impaired function of bovine alveolar macrophages infected with parainfluenza-3 virus. *Am J Vet Res*. 46, 1740-1744.
 25. Maillard R, Assie S, Douart A. (2006). Respiratory disease in adult cattle. Proceedings of the 24th World Buiatrics Congress, October 15-19, Nice-France.
 26. Murray GM, More SJ, Sammin D, Casey MJ, McElroy MC, O'Neill RG, Byrne WJ, Earley B, Clegg TA, Ball H, Bell CJ, Cassidy JP. (2018). Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. *J Vet Diagn Invest*. 29, 20-34.
 27. Osterkorn K. (1982). Biometrische Methoden. Virologische Arbeitsmethoden. Band IV. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
 28. Ozel M, Gur S. (2015). Serological investigation for Bovine Viral Diarrhea and Bovine Herpesvirus Type-1 Viruses in Precolostral calves and Their Dams. *Harran Üniv Vet Fak Derg*. 4, 57-63.
 29. Ozturk F, Yavru S. (1988). Konya bolgesi sigirlarında parainfluenza virus-3 (PIV-3) enfeksiyonu uzerinde serolojik arastirmalar. *Selcuk Üniv Vet Fak Derg*. 4, 135-141.
 30. Panciera RJ, Confer AW. (2010). Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 26, 191-214.
 31. Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA. (1959). A myxovirus (SF-4) associated with Shipping fever of cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 135, 147-152.
 32. Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon WG, Duprex P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb R, Lee B, Rota P, Wang L. ICTV Report Consortium (December 2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J Gen Virol*. 100, 1593-1594.
 33. Schefers J, Munoz-Zanki C, Collins JE, Goyal SM, Ames TR. (2008). Serological evaluation of precolostral serum samples to detect Bovine viral diarrhea virus infections in large commercial dairy herds. *J Vet Diagn Invest*. 20, 625-628.
 34. Slauson DO, Lay JC, Castleman WL, Neilsen NR. (1987). Alveolar macrophage phagocytic kinetics following pulmonary parainfluenza-3 virus infection. *J Leukoc Biol*. 41, 412-420.
 35. Snowden G, Van Vleck L, Cundiff L, Benett G. (2006). Bovine respiratory disease in feedlots cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci*. 84, 1999-2008.
 36. Staubli D, Sager H, Haerdi C, Haessig M, Gottstein B. (2006). Precolostral serology in calves born from Neospora-seropositive mothers. *Parasitol Res*. 99, 398-404.
 37. Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbett J, Smith GS, Luther PD, Coswell R. (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg*. 85, 257-270.
 38. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. (2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J*. 51, 1095-1102.
 39. Thomas LH, Wood PDP, Langland JM. (1978). The influence of disease on the performance of beef cattle. *Br Vet J*. 134, 152-161.
 40. Tsai KS, Thomson RG. (1975). Bovine Parainfluenza Type 3 Virus Infection: Ultrastructural Aspects of Viral Pathogenesis in the Bovine Respiratory Tract. *Infect Immun*. 11, 783-803.
 41. Yesilbag K, Gungor B. (2008). Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Prod*. 40, 55-60.
 42. Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, Watson B, Peeples ME, Collins PL, Pickles RJ. (2005). Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J Virol*. 79, 1113-1124.



Determination of the effects of Enrofloxacin, Linco-Spectin and Florfenicol Antibiotics on BHK-21 cell culture and FMD 146S virus particles-infective titers

Banu Bayri Özbilge¹, Veli Gülyaz², Neslihan Taşçene³, Şükran Yılmaz⁴, Yasemin Gültekin⁵,
Ayşenur Ulusoy⁶, Mustafa Hasöksüz⁷, Gonca Öztap⁸

^{1,3,4,5,6} FMD (Sap) Institute, Çankaya, Ankara, Turkey

^{2,8} General Directorate of Food and Control, Ministry of Agriculture and Forestry, Çankaya, Ankara, Turkey

⁷ Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Istanbul University-Cerrahpaşa, Istanbul, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 30.04.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 21.05.2020

Abstract: Enrofloxacin, linco-spectin and florfenicol antibiotics were intended to be used in the BHK-21 An30 cells and the foot and mouth disease virus (FMDV) culture during the vaccine production process. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and cell cultures assays were performed in the BHK-21 An30 cells treated with the antibiotics that took place in this study to determine the concentration that inhibits cell proliferation and adverse effects on cell morphology. Virus cultures were performed by inoculating of FMDV serotypes (A/TUR/11, O/TUR/07, Asia-1/TUR/15) to the treated cell cultures with the antibiotics. 146S and infective titres of the obtained virus suspensions were determined. The non-toxic upper limit was determined to be 15 µg/ml for enrofloxacin and 300 µg/ml for linco-spectin in terms of cell morphology and cell numbers versus positive control (gentamicin, penicillin-streptomycin) and negative control (antibiotic-free medium) as a result of MTT and cell culture tests on BHK cells. It was observed that florfenicol also inhibited cell proliferation and induced cell degeneration, even at a concentration of 5 µg/ml. The mean 146S values of FMD virus cultures containing enrofloxacin and linco-spectin were determined to be 0.49, 0.46, 0.53, 0.47 and 0.30, 0.28 µg/ml for serotype A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 respectively. The mean values of the infective titres were 10^{7.04}, 10^{7.25}, 10^{6.04}, 10^{6.59} and 10^{7.26}, 10^{7.6} pfu/ml for serotype A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 respectively. In the control group used gentamicin, penicillin-streptomycin and antibiotic-free medium, the mean 146S FMD virus particles were obtained as 0.51, 0.50, 0.50; 0.52, 0.55, 0.52 and 0.36, 0.33, 0.30 µg/ml for A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 respectively. The mean values of the FMD infective virus titres were 10^{7.35}, 10^{7.40}, 10^{7.11}, 10^{6.24}, 10^{6.46}, 10^{6.62}, and 10^{7.70}, 10^{7.75}, 10^{7.77} pfu/ml for A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 respectively.

As a result, the infective FMDV titer and 146S results obtained in the control group (gentamicin, penicillin-streptomycin) and FMD virus cultures using enrofloxacin (15 µg/ml) and lincospectin (300 µg/ml) were very close to each other. According to these data, it was concluded that enrofloxacin and lincospectin can be used up to the upper limit in the BHK-21 An30 cell and FMD virus cultures. However, Florfenicol should not be used in cell and virus cultures.

Key words: Antibiotic, BHK cell culture, contamination, FMD virus,

Enrofloxacin, Linco-Spectin ve Florfenicol antibiyotiklerinin BHK-21 hücre kültürü ve FMD 146S virus partikülü-infektif titreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

Özet: Bu proje ile FMD aşısı üretimi sürecinde, hücre ve virus kültürlerinde kullanılan gentamisin, penisilin ve streptomisin antibiyotiklerine ek olarak; enrofloxacin, linco-spectin ve florfenicol antibiyotiklerinin kullanıma alınması amaçlandı. Bu amaçla projede yer alan antibiyotiklerin BHK-21 An30 hücresinde, hücre morfolojilerine olumsuz etki eden ve hücre çoğalmasını inhibe eden konsantrasyonunu belirlemek için MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) testleri ve hücre kültürleri yapıldı. Bu hücre kültürlerine FMD virüslerinin (serotip A/TUR/11, O/TUR/07, Asia-1/TUR/15) inokulasyonu ile virüs kültürleri gerçekleştirildi. Elde edilen virüs süspansiyonlarının 146S ve infektif titre değerleri tespit edildi. BHK-21 An30 hücresi ile yapılan MTT testleri ve hücre kültürleri sonucunda hücre sayıları açısından toksik olmayan üst sınır enrofloxacin için 15 µg/ml ve linco-spectin için 300 µg/ml olarak belirlendi. Florfenikolün ise 5 µg/ml konsantrasyonda dahi, hücre üremesini inhibe ettiği ve hücrede dejenerasyona yol açtığı gözlemlendi. Enrofloxacin (15 µg/ml) ve linco-spectinin (300 µg/ml) kullanılan FMD virüs kültürlerinde ortalama 146S değerleri sırası ile A/TUR/11 için 0.49, 0.46 µg/ml, O/TUR/07 için 0.53, 0.47 µg/ml ve Asia-1 /TUR/15 için 0.30, 0.28 µg/ml olarak; infektif titre değerleri ortalaması ise A/TUR/11 için 10^{7.04}, 10^{7.25} pfu/ml, O/TUR/07 için 10^{6.04}, 10^{6.59} pfu/ml ve Asia-1/TUR/15 için 10^{7.26}, 10^{7.6} pfu/ml olarak tespit edildi. Kontrol grubunda gentamisin, penisilin-streptomisin ve antibiyotiksiz vasat ile hazırlanan virüs kültürlerinde 146S viral partikül değerleri ortalaması sırası ile A/TUR/11 için 0.51, 0.50, 0.50 µg/ml, O/TUR/07 için 0.52, 0.55, 0.52 µg/ml ve Asia-1/TUR/15 için 0.36, 0.33, 0.30 µg/ml olarak

Yazışma adresi / Correspondence: Veli Gülyaz, General Directorate of Food and Control, Ministry of Agriculture and Forestry, Çankaya, Ankara, Turkey E-mail: veligulyaz@yahoo.co.uk, veli.gulyaz@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: 10000-0002-9187-1543 • 20000-0003-0077-6071 • 30000-0003-2075-198X

• 40000-0002-7945-1124 • 50000-0002-5513-9611 • 60000-0002-7426-5461 • 70000-0003-3185-6453 • 80000-0003-2982-7055

bulundu. Aynı kültürlerin infektif titre değerleri ortalaması ise A/TUR/11 için $10^{7.35}$, $10^{7.40}$, $10^{7.11}$ pfu/ml, O/TUR/07 için $10^{6.24}$, $10^{6.46}$, $10^{6.62}$ pfu/ml ve Asia-1/TUR/15 için $10^{7.70}$, $10^{7.75}$, $10^{7.77}$ pfu/ml olarak saptandı. Sonuç olarak kontrol grubu (gentamisin, penisilin-streptomisin) ile enrofloxacin (15 µg/ml) ve linco-spectinin (300 µg/ml) kullanılan FMD virüs kültürlerinde elde edilen infektif FMDV titresi ve 146S sonuçları birbirine çok yakın değerlerde tespit edilmiştir. Elde edilen bu verilere göre, BHK-21 An30 hücre ve FMD virüs kültürlerinde enrofloxacin (15 µg/ml) ve linco-spectinin (300 µg/ml) üst sınırına kadar kullanılabilmesine karşın florfenicolün ise kullanılmaması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik , BHK-21 An30, hücre kültürü, kontaminasyon, şap virüsü

Introduction

Foot and mouth disease (FMD) is the most contagious disease of mammals and has a great potential for causing severe economic loss in susceptible cloven-hoofed animals. There are seven serotypes of FMD virus (FMDV), namely, O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 and Asia 1 (OIE, 2017). The serotypes of FMDV are not distributed uniformly around the world. The serotype O, A and C viruses have had the widest distribution and have been responsible for outbreaks in Europe, America, Asia and Africa. The FMDV particle is roughly spherical in shape and about 25-30 nm in diameter. It consists of the RNA genome surrounded by a protein shell or capsid (Jamal and Belsham, 2013) and causes heavy economic losses to the livestock industry such as high morbidity in adult animals, treatment costs, reduced milk production, loss of working ability in draught animals of developing countries, reproductive disorders and high mortality in young ones (Grubman and Baxt, 2004; Nawaz et al, 2019). The control of FMD is a national and regional responsibility and, in many countries, the vaccine may be used only under the control of the veterinary authority. Sensitive cell culture systems include primary bovine (calf) thyroid cells and primary pig, calf or lamb kidney cells. Established cell lines, such as BHK-21 (baby hamster kidney) and IB-RS-2 cells, may also be used but are generally less sensitive than primary cells for detecting low amounts of infectivity. The sensitivity of any cells used should be tested with standard preparations of FMDV (OIE manuel, 2017; Or and Fidancı, 2009). The FMD vaccine production is carried out by producing of BHK-21 cells in suspended conditions in high capacity reactors (1000, 3000 and 5000 Lt) and infecting with the required FMD vaccine strains. As seen in other cell cultures and vaccine production processes, the biggest problem encountered in FMD vaccine production stages is bacterial and fungal contaminations due to antimicrobial resistance.

Bacterial, yeast, and fungal contamination are hazards to those studying various phases of metabolism and growth of mammalian cells in vitro (Fleckenstein et al, 1994). Although we have used antibiotics for more than 30 years to eliminate or

suppress unwanted microbial contaminants, many who add them to tissue cultures for this purpose are unfamiliar with the products used, the limitations for their use, and the practical value of this strategy (Akkan ve Karaca, 2003; Perlman, 1979). Antibiotics are called bacteriostatic and bactericidal in terms of preventing the growth and reproduction of bacteria and causing their death. Values indicating the potency of antibiotics are MIC (minimum inhibitor concentration) and MBK (minimum bactericidal concentration). In terms of effect spectra, they are called narrow and broad spectrums. As seen in penicillin-streptomycin combinations, the antibacterial spectra can be expanded by making combinations of antibiotics that produce a synergetic effect (Reeves, 2012).

Antimicrobial drugs are divided into 5 groups cell wall synthesis inhibitors (Penicillins and cephalosporins), protein synthesis inhibitors (Macrolides, linkosamides and chloramphenicol), nucleic acid synthesis inhibitors, antimetabolites (Trimethoprim), membrane integrity (polymyxin and nystatin) (Campos et al. 2012; Saran and Karahan, 2010; Reeves, 2012).

It is a big problem that bacteria develop resistance against antibiotics in both invitro and invivo applications. Indicator of resistance development is the gradual increase of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration values of the drug in microorganism (Yarsan, 2012). In addition, bacteria that are resistant to an antibiotic may lose their sensitivity to another antibiotic of similar structure, which is called cross-resistance.

The use of antibiotics in the cell culture medium is a valuable preservative. Gentamicin, which is widely used in cell cultures and is one of the most widely used antibiotics in vaccine production in our Institute; It has a broad spectrum bactericidal activity because of containing an aminoglycoside group. It enters the bacterial cell and irreversibly binds to a receptor in the 30 S subunit, preventing the formation of m-RNA, formyl-methionine and tRNA complexes. It inhibits protein synthesis. Another aminoglycoside group antibiotic, Streptomycin, shows a stronger Gram (+) activity by binding to

30S and inhibits protein synthesis, and has a narrower spectrum than other antibiotics in the same group. Penicillin; on the other hand, it is effective by inhibiting cell wall synthesis, and in combination with streptomycin, their spectrum broadens for many Gram (+) and Gram (-) bacteria. However, antibiotics have many important disadvantages (Freshney, 2005). Antibiotics cause the development of resistant organisms while at the same time hiding the presence of low levels of contamination, causing the formation of resistant strains when the culture conditions change. It also has negative effects on a cell basis. Antibiotics can have adverse effects on cell growth and functions. They can reduce cell yield, growth rate and shorten the life of the cell (Spier and Grifits, 1985). In this way, they can remove the cell from its original state by creating toxic effects on the cell. Therefore, it should not be used in routine cultures; It is recommended for use in limited primary culture development or in large-scale, labor-intensive and costly studies (Freshney, 2005). Antibiotics to be used in mammalian cell cultures are desired to have some properties. Antibiotics with bactericidal effects should be preferred in order to eliminate microbial contaminants. Antibiotics should not suppress mammalian cell metabolism and growth in tissue cultures. It should not affect the intended use of mammalian cells, such as virus production or antigen preparation. The antibiotic should be non-toxic and suitable for use by laboratory personnel. It should also be compatible with other culture media components. Antibiotics to be used in mammalian cell cultures should have cytotoxicity tests performed and certain data should be obtained (Perlman, 1979). With this project, it was aimed to use enrofloxacin, linco-spectin and florfenicol antibiotics instead of gentamycin, penicillin and streptomycin antibiotics due to reasons such as insufficient spectrum or bacterial resistance formation in FMD vaccine production in Turkey.

Materials and Methods

Cell culture: BHK-21 An30 cell culture was obtained from FMD (SAP) institute cell bank laboratory.

Culture media (Applichem-A-1321): Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) medium was used in cell culture and FMD virus production.

Fetal calf serum (Biochrom): It was inactivated at 56°C for 30 minutes and used by adding 10 and 2 % to the cell and virus production medium respectively.

Trypsin EDTA solution 0.25% (Sigma T-5775): The commercial trypsin-EDTA solution was used during the passaging of cells.

Viruses: FMD serotype A, O and Asia-1 type viruses (A/TUR/11, O/TUR/07, Asia-1/TUR/15) were obtained from the FMD (SAP) institute virus bank laboratory.

Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) test dye (Sigma-5655): MTT dye (was dissolved in RPMI-1640 medium without phenol red and filtered at 0.2µm filter and kept at -20 °C as 5 ml.

Gum Tragacanth (Sigma 9000-65-1): Gum was used as a covering medium in determining infective titer, it was dissolved 1.3% in distilled water. After autoclaving at 121°C for 20 minutes, it was mixed 50%+50% (v/v) with 2XGMEM medium. It was used after the addition of 1% sodium bicarbonate.

Antibiotics:

1. Gentamycin (Applichem-A4854),

Penicillin (Applichem-A1837), **Streptomycin**

(Applichem-A1852): Powder antibiotics were dissolved with distilled water and sterilized through a 0.22 µm porous filter. After preparing 10.000 ppm stock solutions, it was added to cell and virus production media according to the working concentrations.

2. Enrofloxacin (Deva-1000025), Lincomycin (Deva-1000091), Spectinomycin (Deva-1000692): Enrofloxacin and linco-spectin were dissolved in 0.1% formic acid and distilled water respectively. Following, 10,000 ppm stock solutions of both antibiotics were prepared.

3. Florfenicol (Teknovet-201401037): The antibiotic supplied as the powder was dissolved with distilled water and a stock solution of 1,000 ppm was prepared. All stock solutions were sterilized by passing through a 0.22 µm porous filter. It was used by adding to cell and virus production media according to the study concentrations.

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

squares) and calculate the cell concentration as follows: (Gunetti et al, 2012).

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

Determination of cytotoxicity of antibiotics in BHK-21 An30 cell culture by MTT test

MTT test was performed to determine the concentration ranges of antibiotics that negatively affect on cell morphology and proliferation. For this purpose, the stock solutions of the antibiotics of the control and experimental groups were diluted with cell culture medium containing 10% serum to obtain final concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 µg/ml.

BHK-21 An30 cells were prepared as monolayer in 96 well plates with 4×10^4 cells/ml. The medium was removed from all wells after incubation at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours. The cell culture media with antibiotics and without antibiotics were added to the plates as 100 µl/well and incubated at 37°C with 5% CO₂. Eight eyes from top to bottom were used for each concentration of control and trial group antibiotics. In order to evaluate as a cell control and negative control, 16 wells were used for the medium without antibiotics. For each antibiotic, 5 plates were prepared to evaluate at 24, 48, 72, 96, and 120 hours. At the end of the incubation periods, a plate prepared for each antibiotic was taken and observed under a microscope and then the media were removed. Serum free medium without antibiotics was placed as 100 µl in to the all wells. Later, MTT dye (13 µl/well) was dissolved at the time of use and added in the dark place. All the plates were covered with aluminum foil and left in incubation at 37°C with 5% CO₂ for 4 hours. At the end of the incubation period, 100 µl of isopropyl alcohol was added to each well by observing the formazan crystals. It was read at 570 nm in the spectrophotometer and the results were recorded. The results were recorded at the end of 48, 72, 96, and 120 hours for each antibiotic.

Considering the first MTT test results, a new test was designed for the experimental group antibiotics by determining new concentration ranges. For this purpose, stock solutions of antibiotics of the control and experimental groups were used. Enrofloxacin and linco-spectin were added to cell culture media containing %10 serum with final concentrations of 10, 50, 80, 100, 200, 400, 500, 600, 800, and 1000 µg/ml. Florfenicol at final concentrations of 10 µg/ml, 30, 50, 80, 100, 120, 140, 160, 180, and 200 µg/ml

were prepared in cell culture media containing %10 serum. MTT tests of antibiotics at new concentration ranges were performed with the same procedure.

Results were evaluated according to FMD (SAP) Institute protocol; Cytotoxicity test (with MTT) formula was used as % viability = $\frac{\text{test}_{\text{absorbansort}}}{\text{Control}_{\text{absorbansort}}} \times 100$. According to formula; the results were evaluated as non-toxic (>%90 cell viability), low toxic (60-90% cell viability), moderately toxic (30-59% cell viability) and toxic (<%30) (Holst-Hansen and Brünner, 2000).

Determination of antibiotic concentrations that negatively affect the morphology and proliferation of BHK-21 An30 cells

Determination of the toxic level of antibiotics:

Enrofloxacin: Cell culture media were prepared in final concentrations of 10, 30, 50, 80, 100, 200, and 400 µg/ml using stock solutions of antibiotics of enrofloxacin and control group (gentamicin and penicillin-streptomycin). BHK-21 An30 cells were trypsinized and resuspended with the antibiotic-free medium and divided into 22 flasks (25 cm²) with 4×10^5 cells/ml. Cell culture media prepared with antibiotic solutions of enrofloxacin and control group (gentamicin and penicillin-streptomycin) were added in to the flasks and incubated in incubator with %5 CO₂ at 37°C for 48 hours. At the end of the 48 hour, the monolayer ratio of the cells was observed. The media in the flasks were poured and made trypsinization. The cells in each flask were resuspended with their own media and the cell numbers and morphological features were recorded with the Burker slide method.

According to the toxicity results obtained by the first dilution set, a second dilution range was determined. Another set of concentrations were prepared again for the final concentrations of 10, 15, 20, 25, and 30 µg/ml enrofloxacin in cell culture media. These cell culture media were added to 16 flasks (25 cm²) containing BHK-21 An30 cells and incubated for 48 hours in a 37°C incubator with 5% CO₂. At the end of the 48th hour of each subculture, the confluency of the cells was observed, and the used medium was discarded and cells were harvested by trypsin. Each flask was resuspended with its medium and the cell counts and morphological properties were recorded with the Burker slide method. The cells ($4,0 \times 10^5$ cell/ml) were transferred to flasks and subcultured three times with its medium. The same procedure was repeated three times.

Linco-Spectin: The cells in each flask were re-suspended with their media and the cell numbers and various concentrations linco-spectin and control group of antibiotics (gentamicin and penicillin-streptomycin) were prepared in cell culture media from stock solutions. The concentrations were 50, 80, 100, 200, 400, 600, and 800 µg/ml. Monolayer BHK-21 An30 cells from the same line as the cell used in the MTT test were grown. BHK-21 An30 cells were harvested by trypsin and re-suspended with the antibiotic-free medium and divided into 22 flasks (25 cm²) each contained 4x10⁵ cells/ml. The cell culture media prepared with antibiotic solutions of linco-spectin and control group (gentamicin and penicillin-streptomycin) were added into the flasks and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours. At the end of the 48 hours, the confluency of the cells was observed by a microscope. The media in the flasks were discarded and the cells were harvested by trypsin and morphological features were recorded with the Burker slide method.

According to the toxicity results obtained by the first dilution set, a second dilution range was determined. Another set of concentrations was prepared again for the final concentrations of 100, 200, 300, and 400 µg/ml linco-spectin in cell culture media. These cell culture media were added to 16 flasks (25 cm²) containing BHK-21 An30 cells and incubated for 48 hours in a 37°C incubator with 5% CO₂. At the end of the 48th hour of each subculture, the confluence of the cells was observed, and the used medium was discarded and cells were harvested by trypsin. Each flask was resuspended with its medium and the cell counts and morphological properties were recorded with the Burker slide method. The cells (4,0x10⁵ cell/ml) were transferred to flasks and subcultured three times with its medium. The same procedure was repeated three times. A control flask without antibiotics was kept in the same conditions.

Florfenicol: Various concentrations florfenicol and a control group of antibiotics (gentamicin and penicillin-streptomycin) were prepared in cell culture media from stock solutions. The concentrations were 10, 30, 50, 80, and 100 µg/ml. Monolayer BHK-21 An30 cells from the same line as the cell used in the MTT test were grown. BHK-21 An30 cells were harvested by trypsin and re-suspended with the antibiotic-free medium and divided into 16 flasks (25 cm²) each contained 4x10⁵ cell/ml. Cell culture media prepared with antibiotic solutions of florfenicol and the control group (gentamicin and penicillin-streptomycin) were added into the flasks and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours. At

the end of the 48 hours, the confluency of the cells was observed by a microscope. The media in the flasks were discarded and the cells were harvested by trypsin. The cells in each flask were re-suspended with their media and the cell numbers and morphological features were recorded with the Burker slide method.

According to the toxicity results obtained by the first dilution set, a second dilution range was determined. Another set of concentrations was prepared again for the final concentrations of 5 and 10 µg/ml florfenicol in cell culture media. These cell culture media were added to 16 flasks (25 cm²) containing BHK-21 An30 cells and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours. At the end of the 48th hour of each subculture, the confluency of the cells was observed, and the used medium was discarded and cells were harvested by trypsin. Each flask was resuspended with its medium and the cell counts and morphological properties were recorded. The cells (4,0x10⁵ cell/ml) were transferred to flasks and subcultured three times with its medium. The same procedure was repeated three times. A control flask without antibiotics was kept in the same conditions.

Virus culture in cells with media prepared with antibiotic concentrations below toxicity levels

In the virus cultures of A, O and Asia-1 serotypes of FMD virus with known 146S particle amount and infective titers were used (A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia/TUR/15). In cell culture, BHK-21 An30 cells (with media and antibiotics belonging to below the toxic concentration level) in 25 cm² flasks were inoculated 1 virus of A, O, and Asia-1 types of FMD virus per 50-100 cells. Media prepared with its antibiotic concentration were used in each flask. Flasks were incubated at 37°C with 5% CO₂ after virus inoculation, and the time during which 100% CPE (Cytopathogenic Effect) formation was recorded. Virus-grown flasks were frozen and thawed, centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The same procedures were repeated three times.

Detection of FMD 146S virus particles and infective titers:

146S virus particles: The determination of 146S virus particle size was done by SDG (Sucrose Density Gradient) method in FMD (ŞAP) Institute Protocol (2010). With the help of the gradient maker, a linear gradient was obtained in the ultracentrifuge tube by layering sucrose concentrations starting with 45% sucrose at the bottom and 15% sucrose at the top. 0.5 ml of virus sample was added slowly over

the gradients and the tubes were placed in the ultracentrifuge godet. Godet was placed in the rotor and centrifuged at 41.000 rpm for 2 hours at +4°C temperature in a vacuum condition. At the end of the centrifuge, to ensure that the samples pass through a computer-connected UV detector (254 nm), the device was started to be dispensed from the bottom of the tube and at a suitable flow rate of 60% sucrose base. When the sample started to pass through the detector, the appropriate absorbance width was set and the computer program (Chroma Simple) was started. After the peak occurred in the program, the starting and ending points of the peak are drawn; the program automatically calculated the amount of 146S particles ($\mu\text{g}/\text{ml}$) measured as the area of the peak.

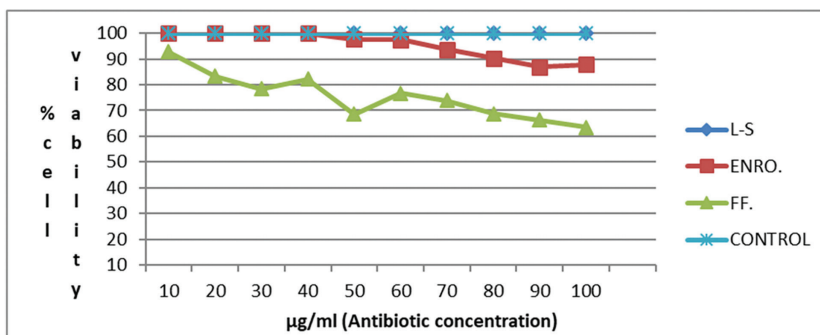
Plaque Test (infective titer): In order to determine the infective titer of FMD viruses and to examine the plaque characters, dilutions of FMD virus (log₁₀) from 10^{-1} to 10^{-6} were prepared and inoculated as 100 μl per well into monolayer BHK-21 An30 cells produced in 6-well plates. For adsorption, the plates were left in the incubator at 37°C with 5% CO₂ for 1 hour and 3 ml medium (containing 50% GUM + 50% GMEM 2X) was added to each well at the end of this period. The Plates were incubated again for 48 hours at 37°C with 5% CO₂. At the end of the period, the media was poured and 2 ml of dyeing solution prepared with crystal violet were added to each well. Finally, the dyeing solution was spilled and all plates were washed with distilled water. In the evaluation, plaques formed by the fmd virus were counted at the latest dilutions and infective titers were calculated as PFU/ml (Baer and KeHN-Hall, 2014; Berg et al, 1963).

Statistical Analysis

All data were analyzed with Shapiro-Wilk and Levene Statistical tests. According to results of these tests, One-Way Analysis of Variance (ANOVA) statistical test was performed to detect the differences between average values of groups. In addition to distinguish the significance of the differences between groups for levels of FMD 146S viral particles and infective titers of FMD virus serotypes, Duncan multiple range test was used. All the datas were evaluated on the 95% confidence interval and SPSS 22.0 (Inc., Chicago II, USA) software was used.

Results

Cytotoxicity Assay (MTT): According to the results of the MTT test performed after the 5-day incubation of cells in the first prepared concentration ranges of the antibiotics used in the study, cell viability was measured as 100% and above absorbances in all dilutions in the control group (gentamicin, penicillin-streptomycin, and medium without antibiotics). In linco-spectin, one of the experimental group antibiotics, it was determined that the cell viability equivalent to the control group was measured, while 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in enrofloxacin, and then cell viability dropped below 90%. In florfenicol, on the other hand, determined cell viability at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as 83.31% and continued to decrease at subsequent concentrations, and absorbance of 63.38% at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was measured. The second concentration studies of florfenicol were not carried out since florfenicol caused high cell death even at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. In light of the first MTT test results, the second test was designed for experimental group (Linco-spectin and Enrofloksasin) antibiotics by determining new concentration ranges (Graphic 1).



Graphic 1. MTT Test results-1

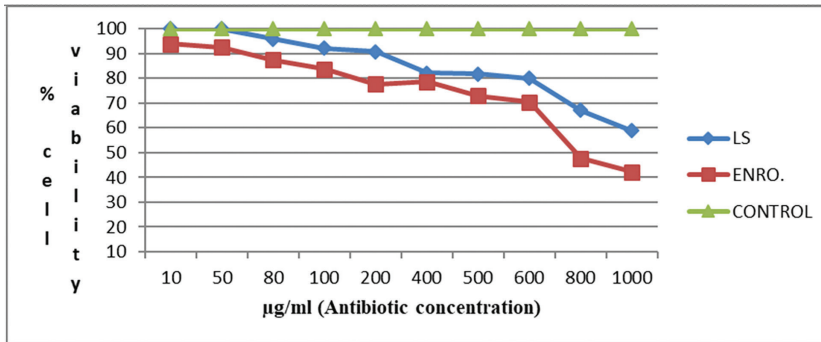
(L-S: Linco-spectin, Enro: Enrofloxacin, FF: Florfenicol)

In the control group (gentamicin, penicillin-streptomycin, and medium without antibiotics), the average of the test values obtained for 5 days; Cell viability was measured at 100% and above absor-

bances at all dilutions. Over 90% of cell viability was observed at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ linco-spectin, one of the experimental group antibiotics. The cell viability, measured as 82.2% at 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the antibiotic,

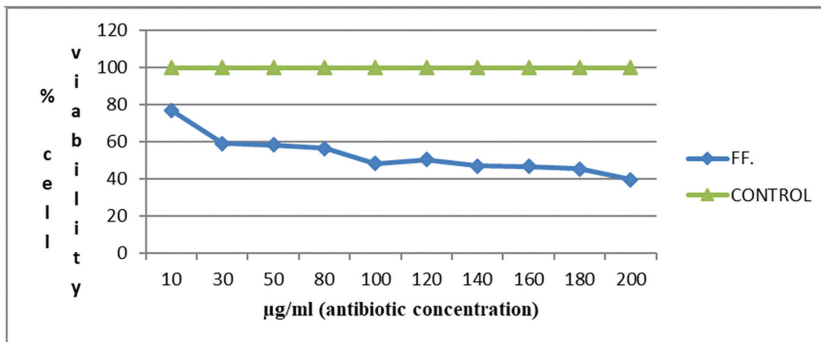
continued to decrease in subsequent concentrations, and 58.94 % cell viability at the highest 1000 µg/ml concentration was measured. In enrofloxacin, the cell viability was measured at the last concentration of 42.23 %, again with 80 µg/ml and 90 % cell viability below 90 %, and the subsequent decline continued (Graph 2).

Looking at the average of test values obtained for 5 days in the study with Florfenicol; Cell viability was measured in the control group (gentamicin, penicillin-streptomycin, and medium without antibiotics) as 100 % and above absorbances in all dilutions. Florfenicol decreased cell viability to 76.89 % at a concentration of 10 µg/ml and to 39.63 % at the final concentration (100 µg/ml). (Graphic 3).



Graphic 2. MTT Test results-2 (Group-1)

(L-S: Linco-spectin, Enro: Enrofloxacin)



Graphic 3. MTT Test results-3 (Group-2)

(FF: Florfenicol)

Effect of antibiotics on BHK-21 An30 cell reproduction

Enrofloxacin: As a result of passages on BHK-21 An30 cells at 10 µg/ml concentration of enrofloxacin, it was observed that the cell numbers were equivalent to the control group cell numbers in each passage. Cell concentrations decreased at 30 µg/ml and above concentrations, numbers started to decrease and degenerations were observed in cell morphology. In the rest of the passages, it was found that the cells were not attached to the flask's surface (Graph. 4). With the narrowing of the concentration ranges, enrofloxacin at 10 µg/ml and 15 µg/ml concentrations were observed to be equivalent to cell numbers of the control group at each passage. However, at concentrations of 20 µg/ml and above, the cell confluency was decreased and

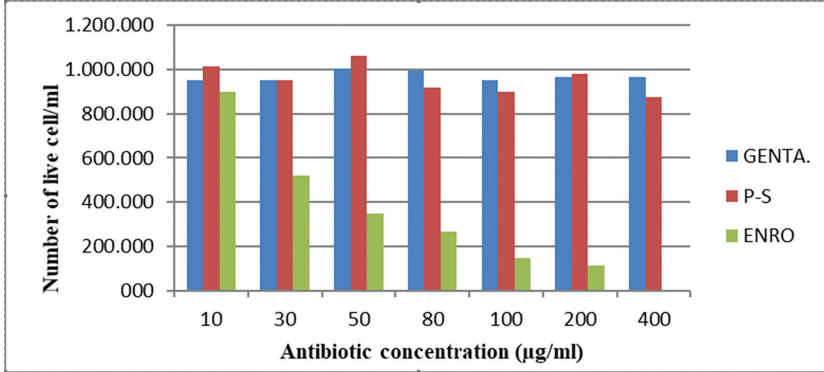
gaps between cells were formed, cell numbers were decreased and degenerations in cell morphology were observed (Graph. 5). 15 µg/ml was determined as the upper limit and cells were propagated for virus inoculation at the 3rd passage.

Linco-spectin: It was determined that the number of cells up to 200 mg/ml concentrations of linco-spectin was equal or even above the mean of the control group cell numbers in each passage. It was observed that the cell numbers-coating rate decreased and degenerations started in cell morphology at concentrations of 400 µg/ml and above (Graph. 6).

At the end of the repeated passages of BHK-21 An30 cell, it was observed that the number of cells propagated with medium containing linco-spectin at 300 µg/ml and lower concentrations were equiv-

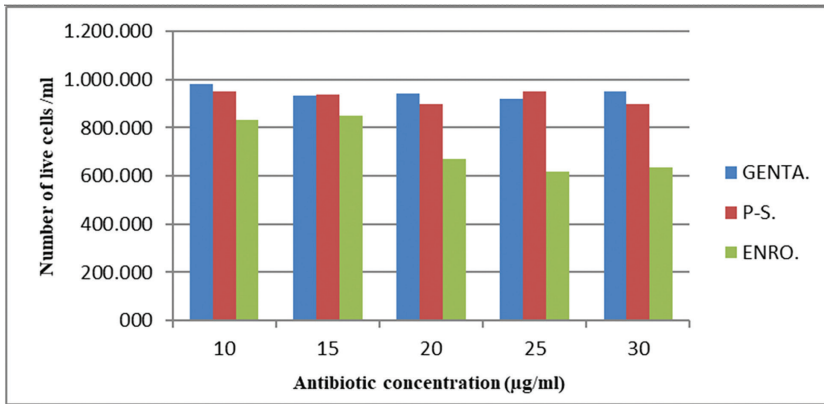
alent to the mean cell numbers of control group at each passage. At the 400 µg/ml concentration, the cell coverage rate and the cell numbers decreased.

Morphological cell degenerations were determined at concentrations above 300 µg/ml dilution of the Linco-spectin (Graph. 7).



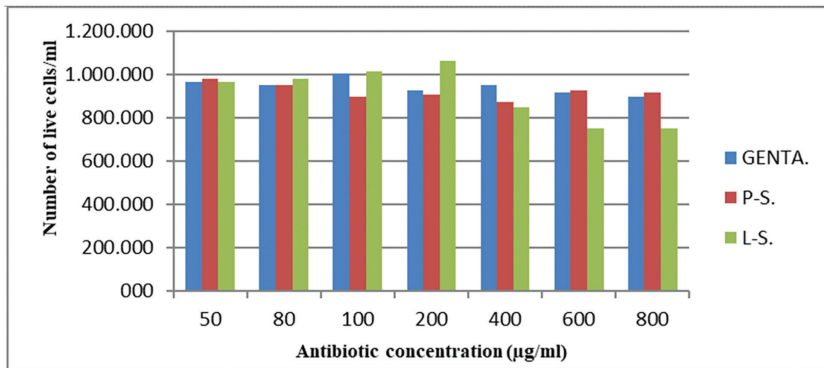
Graphic 4. Evaluation of the first monolayer cell cultures prepared with enrofloxacin media

(GENTA:Gentamycin, P-S: Penicillin-Streptomycin, ENRO: Enrofloxacin)



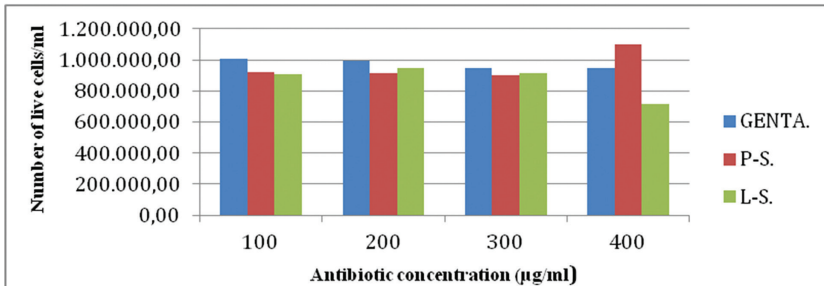
Graphic 5. Evaluation of second monolayer cell cultures prepared with enrofloxacin media

(GENTA:Gentamycin, P-S: Penicillin-Streptomycin, ENRO: Enrofloxacin)



Graphic 6. Evaluation of first monolayer cell cultures made with media prepared with linco-spectin

(GENTA:Gentamycin, P-S: Penicillin-Streptomycin, L-S: Lincomycin-Spectinomycin)

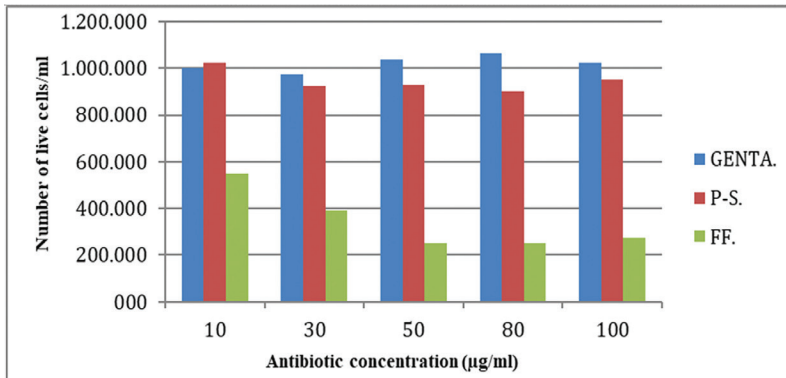


Graphic 7. Evaluation of second monolayer cell cultures prepared with linco-spectin-media

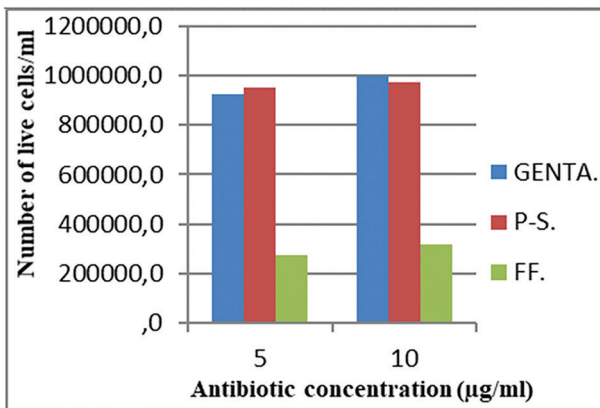
(GENTA:Gentamycin, P-S: Penicillin-Streptomycin, L-S: Lincomycin-Spectinomycin)

Florfenicol: At the end of the passages of the BHK-21 An30 cell propagated with media at the concentrations of florfenicol at 5 µg/ml and 10 µg/ml, the number of cells was too below according to average number of control cells (Graph. 8). Even in the

first passage of cell at concentrations of florfenicol at 30 µg/ml and above, the cell morphologies were disrupted and cells could not adhere into the flask surface. In addition, the degenerations increased in the following passages (Graph. 9).



Graphic-8. Evaluation of first monolayer cell cultures prepared with florfenicol media (GENTA:Gentamycin, P-S: Penicillin-Streptomycin, FF: Florfenicol)



Graphic-9. Confluent ratio and cell numbers in second monolayer cell cultures made with florfenicol media (GENTA:Gentamycin, P-S: Penicillin-Streptomycin, FF: Florfenicol)

Effects of antibiotics on the FMD 146S virus particles: Following inoculation of FMD A, O and ASIA-1 serotypes into cell cultures within 25 cm² flasks at

the 3rd passage level, the CPE formation belonging to FMD virus and pH of the medium was observed in the infected flasks during the incubation period. Serotypes A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 of the FMD viruses reached 100% CPE levels approximately at the 30, 21 and 24th hours of incubation, respectively.

The average amount of the FMD 146S virus particles in suspensions produced with control group antibiotics (Gentamicin, penicillin-streptomycin, medium without antibiotics) were obtained as 0.51, 0.50, 0.50 µg/ml for A/TUR/11; 0.53, 0.55, 0.53 µg/ml for O/TUR/07 and 0.34, 0.32, 0.30 µg/ml for ml and Asia-1/TUR/15. FMD 146S viral particles in virus suspensions produced containing enrofloxacin were determined to be 0.49 µg/ml, 0.53 µg/ml and 0.30 µg/ml for A/TUR/11, O/TUR/07, and Asia-1/TUR/15 respectively (Table 1).

Table 1. Amounts of FMD 146 S viral particles in virus suspension produced with control group and media with enrofloxacin.

Treatment Groups	Levels of 146S viral particles FMD serotypes (µg/ml)											
	A Tur.11				O Tur. 07				Asia-1 Tur.15			
	Mean value (X)	SX	SEM	P value	Mean value (X)	SX	SEM	P value	Mean value (X)	SX	SEM	P value
Gentamicin	0,510	0,02	0,008	0,61	0,530	0,04	0,015	0,44	0,340 ^a	0,03	0,012	0,017
Penicillin-Streptomycin	0,504	0,02	0,008		0,554	0,02	0,011		0,321 ^{ab}	0,02	0,010	
Media without antibiotics	0,502	0,02	0,008		0,535	0,02	0,009		0,304 ^{ab}	0,03	0,012	
Enrofloxacin (15µg/ml)	0,492	0,02	0,010	0,53	0,02	0,010	0,300 ^b	0,03	0,012			

SX: Standart Deviation, SEM: Standart Error Mean, p: Significance

a,b: Mean values within the same column carrying different superscripts are significantly different at p<0,05.

Average titers of FMD 146S virus particles propagated by the media, including the control group antibiotics (gentamicin, penicillin-streptomycin, median without antibiotics) were obtained at 0.51, 0.50, 0.50 µg/ml for A/TUR/11, 0.51, 0.55, 0.53 µg/ml for O/TUR/07 and 0.38, 0.34, 0.30 µg/ml for Asia-1/

TUR/15. The mean amount of FMD 146S virus particles produced with media containing linco-spectin were determined to be 0.46, 0.47 and 0.28 µg/ml for A/TUR/11, O/TUR /07 and Asia-1/TUR /15 respectively (Table 2).

Table 2. Amount of the FMD 146 S viral particles in virus suspension produced with control group and media with linco-spectin.

Treatment Groups	Levels of 146S viral particles FMD serotypes (µg/ml)											
	A Tur.11				O Tur. 07				Asia-1 Tur.15			
	Mean Value (X)	SX	SEM	p value	Mean Value (X)	SX	SEM	p value	Mean Value (X)	SX	SEM	p value
Gentamicin	0.510 ^a	0.038	0.014	0.02	0.512 ^{ab}	0.037	0.014	0.03	0.380 ^a	0.02	0.010	0.001
Penicillin-Streptomycin	0.500 ^{ab}	0.035	0.013		0.550 ^a	0.047	0.017		0.340 ^{ab}	0.04	0.016	
Media without antibiotics	0.500 ^{ab}	0.035	0.035	0.530 ^a	0.040	0.015	0.300 ^{bc}	0.03	0.013			
Linco-Spectin (300µg/ml)	0.460 ^b	0.039	0.034	0.470 ^b	0.030	0.011	0.280 ^c	0.02	0.010			

SX: Standart Deviation, SEM: Standart Error Mean, p: Significance

a,b,c: Mean values within the same column carrying different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

The infective titer of the FMD virus

Effect of enrofloxacin on FMD infective virus titer:

The average infective titers of the control group antibiotics (gentamicin, penicillin-streptomycin, median without antibiotics) were found to be $10^{7.39}$, $10^{7.46}$, $10^{7.06}$ pfu/ml for A/TUR/11; $10^{6.24}$, $10^{6.42}$, $10^{6.49}$

pfu/ml for O/TUR/07 and $10^{7.69}$, $10^{7.73}$, $10^{7.84}$ pfu/ml for Asia-1/TUR/15 respectively. The mean infective titers of FMD serotype A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 propagated with medium containing enrofloxacin were determined to be $10^{7.04}$, $10^{6.04}$ and $10^{7.26}$ pfu/ml (Table 3).

Table 3. The infective titers of FMD virus serotypes propagated by media with Enrofloxacin

Treatment Groups	Levels of the infective titers of FMD serotypes (pfu/ml)											
	A Tur.11				O Tur. 07				Asia-1 Tur.15			
	Mean Value (X)	SX	SEM	p value	Mean Value (X)	SX	SEM	p value	Mean Value (X)	SX	SEM	p value
Gentamicin	7.392 ^a	0.034	0.01	0.001	6.240 ^b	0.151	0.05	0.001	7.69 ^a	0.22	0.08	0.002
Penicillin-Streptomycin	7.462 ^a	0.172	0.06		6.420 ^a	0.124	0.04		7.73 ^a	0.15	0.05	
Media without antibiotics	7.061 ^b	0.180	0.06	6.490 ^a	0.160	0.06	7.84 ^a	0.25	0.09			
Enrofloxacin (15µg/ml)	7.040 ^b	0.252	0.09	6.042 ^c	0.184	0.06	7.26 ^b	0.16	0.06			

SX: Standart Deviation, SEM: Standart Error Mean, p: Significance

a,b,c: Mean values within the same column carrying different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Effect of Linco-Spectin on FMD infective virus titer

Infective titers of FMD virus produced with control group antibiotics (gentamicin, penicillin-streptomycin, medium without antibiotics) of A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 were determined to be $10^{7.31}$, $10^{7.35}$, $10^{7.16}$ pfu/ml; $10^{6.24}$, $10^{6.51}$, $10^{6.74}$ pfu/ml

and $10^{7.71}$, $10^{7.77}$, $10^{7.70}$ pfu/ml respectively. Infective titers of the FMD virus cultured containing linco-spectin were determined as Log $10^{7.25}$, $10^{6.59}$ and $10^{7.60}$ pfu/ml for A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15 respectively (Table 4).

Table 4. The infective titers of FMD virus serotypes propagated by media with linco-spectin

Treatment Groups	Levels of the infective titers of FMD serotypes (pfu/ml)											
	A Tur.11				O Tur. 07				Asia-1 Tur.15			
	Mean Value (X)	SX	SEM	p value	Mean Value (X)	SX	SEM	p value	Mean Value (X)	SX	SEM	p value
Gentamicin	7.301	0.113	0.04	0.32	6.241b	0.06	0.02	0.002	7.71	0.16	0.06	0.59
Penicillin-Streptomycin	7.350	0.142	0.05		6.510a	0.261	0.09		7.77	0.25	0.09	
Media without antibiotics	7.160	0.330	0.12		6.741a	0.185	0.07		7.70	0.27	0.10	
Linco-Spectin 300µg/ml	7.250	0.093	0.03		6.590a	0.284	0.10		7.60	0.21	0.07	

SX: Standart Deviation, SEM: Standart Error Mean, p: Significance

a,b: Mean values within the same column carrying different superscripts are significantly different at $p < 0,05$.

Statistical Analysis

In the comparison made according to Table 1, there was no statistical difference between the A/TUR/11 and O/TUR/07 serotypes FMD 146S virus particles average values and it was observed that they showed a similar effect with each other. In Asia-1/TUR/15 serotype; the highest values were obtained from the medium containing gentamicin. A statistically significant difference was found between the group containing gentamicin and the medium containing enrofloxacin (15 µg/ml), but it was observed that the average values of all four groups were quite close to each other (Table 1). According to Table 2, the A/TUR/11 and O/TUR/07 serotypes FMD 146S virus particles average values of Linco-Spectin (300 µg/ml) were determined as 0.46 and 0.47 µg/ml, respectively. In Asia-1/TUR/15 serotype, the mean value was found to be slightly lower at 0.28 µg/ml compared to the other two serotypes. Although there are some statistical differences in FMD 146S virus particle's average values of the four groups, it has been observed that the values are close to each other.

In infective titer values of enrofloxacin (15 µg/ml), slightly lower titer values were found compared to other groups (Table 3). There was no statistical difference for serotypes A/TUR/11 and Asia-1/TUR/5 in comparison of infective titer values of linco-Spectin (300 µg/ml) with other groups. For the serotype O/TUR/07, similar titer values were detected for Linco-Spectin, penicillin-streptomycin, and antibiotic-free medium. However, lower infective titer values were obtained in the group containing only gentamycin as an antibiotic (Table 4).

Consequently, in the virus growth media with enrofloxacin 15 µg/ml and linco-Spectin 300 µg/ml used in the study, it was statistically shown that they do not harm the FMD 146S virus particle and

that they produce very close infective titer values with penicillin-streptomycin and gentamicin. With the obtained results, it was found that enrofloxacin 15 µg/ml and linco-Spectin 300 µg/ml levels can be used in cell growth media. It was concluded that florfenicol should not be used in cell and virus cultures because of its toxic effects even at the 5 µg/ml concentration on cells, and it was not included in the statistical analysis.

Discussion and Conclusion

The most widely used antibiotics in cell cultures are; penicillin (50-100 IU/ml), streptomycin (50-100µg/ml), gentamicin sulfate (50-100 µg/ml). In addition, kanamycin sulfate (100 µg/ml), neomycin sulfate (50 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml), carbenicillin (0.1-75 µg/ml), chloramphenicol (5 µg/ml), ciprofloxacin (10 µg/ml) and tetracycline (10 µg/ml) are commonly used antibiotics. These rates recommended for antibiotics were determined for serum-containing media. These rates are usually reduced by 50 % due to the increased cytotoxic effect of antibiotics in serum-free conditions. Besides, the effects of antibiotics are tried to be expanded by combining antibiotics to create a synergistic effect (Perlman, 1979).

FMD, one of the most devastating diseases of livestock, can cause significant economic losses worldwide and remains the most important constraint to international trade in live animals and animal products (Çokçalışkan et al, 2016). FMDV is divided into seven serotypes with no cross-protection conferred among the serotypes (Xiao et al. 2016). Vaccination is very important in combating FMD disease. Production of vaccines against FMD disease is carried out in suspended BHK cell cultures. One of the most important problems encountered during vaccine production is bacterial contamination of cell cultures. The use of antibiotics as a preservative

against bacterial contamination, which is one of the biggest problems in the production of cell cultures, has become imperative especially in large-scale systems. Gentamycin, penicillin, and streptomycin are routinely used for protective purposes against bacterial contamination in the production of large volumes of FMD vaccine. However, although these antibiotics (gentamicin, penicillin, and streptomycin) are used in FMD vaccine production, bacterial contaminations due to bacteria resistant to these antibiotics are frequently observed. Therefore, this study was needed. This study was carried out to provide the use of enrofloxacin, linco-spectin, and florfenicol antibiotics as an alternative to antibiotics (gentamicin, penicillin, and streptomycin) for different times in current use. For this purpose, cytotoxicity tests were performed during the cell, and virus cultures were determined and results showed that the non-toxic upper limit of enrofloxacin was 15 µg/ml, for linco-spectin 200 µg/ml while florfenicol had a toxic effect even at very low concentrations.

Uphoff et al. (2012), used 25 µg/ml enrofloxacin (Baytril), for the treatment of mycoplasma contamination in cell culture. Liu et al. (2015) reported enrofloxacin related cytotoxic effects and induction of apoptosis for the treatment of *Ctenopharyngodon idellus* in the hepatic cell line. The cytotoxic effect was directed by apoptosis and this apoptosis occurs in a dose-dependent manner. Besides, in the cultures performed with the same researchers with different concentrations of enrofloxacin (12.5-200 µg/ml), apoptosis was induced at doses after 50 µg/ml and the cytotoxic effect was observed at continued doses, especially 200 µg/ml.

Lim et al. (2008), in their study on the effects of enrofloxacin on canine tendon cells and invitro chondrocyte proliferation, enrofloxacin was used in the concentration range of 10-200 µg/ml. enrofloxacin inhibited cell proliferation depending on dose and time. Also, the same investigators demonstrated that high concentrations of enrofloxacin (200 µg/ml) induce DNA degradation and apoptosis. Egerbacher et al. (2001), conducted another study showed the dose-dependent effect of enrofloxacin.

The effect of enrofloxacin and ciprofloxacin in dog and horse chondrocyte cells was investigated in vitro, enrofloxacin tested between 10 and 150 µg/ml concentrations. Quinolones have been reported to reduce cell adhesion to culture vessels at increasing concentrations, creating an irregular integrin signal, thereby affecting cellular changes (Egerbacher et al. (2001). In this study, the limit determined for

enrofloxacin (15 µg/ml) below the toxic threshold reported by other studies.

Hu et al. (1989), reported that There was no negative effect of lincomycin on cell viability. In a study on human melanocytes (Naughton et al. 1983), spectinomycin was used in addition to gentamicin and penicillin as a preservative in cell production media. In our study, since the linco-spectin did not harm cell viability at a higher concentration (300 µg/ml) compared to other antibiotics, the results are consistent with other studies.

The concentration of highly immunogenic and resistant 146S particles in raw materials is of great importance for FMD vaccine production (Doronin et al. 2019). Vaccine doses to be given to animals in FMD vaccine production are calculated in µg/ml of FMD 146S virus particles. In this study, the average FMD 146S virus particle amounts obtained in the vaccine suspension produced by the virus-producing medium containing gentamicin, penicillin-streptomycin) (A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15; were 0.46 µg, 0.47 µg/ml and 0.28 µg/ml respectively and 146S FMD virus particle amounts with 300 µg/ml linco-spectin containing medium produced A/TUR/11, O/TUR/07 and Asia-1/TUR/15; were 0.46 µg/ml, 0.47 µg/ml, 0.28 µg/ml respectively. The results were very close to each other.

The amount of 146S FMD virus particles obtained with medium containing enrofloxacin (15 µg/ml) and the amount obtained with the medium of penicillin-streptomycin (0.44 µg/ml) was close regarding 146S (0.45 µg/ml) amount. No negative effect of enrofloxacin on the formation of 146S virus particles of the FMD virus was seen. Besides, the infective titers of FMD virus serotypes produced with medium contained Enrofloxacin (15 µg/ml) were similar to the gentamicin and penicillin-streptomycin-contain medium's FMD virus titers in this study. Results showed that enrofloxacin did not have an inhibitory effect on the production of the FMD virus at a dose of 15µg/ml.

As a conclusion, the use of enrofloxacin and linco-spectin up to the concentrations of 15 µg/ml and 300 µg/ml in media, for BHK-21 An30 cell culture in the FMD vaccine production process is safe, contaminations from bacteria in the spectrum of these antibiotics can be prevented in cell cultures. In this way, it has been concluded that the economic burden caused by contaminations would be prevented; so the antibiotics will contribute to minimizing the loss of labor.

Acknowledgement: This project was supported by the Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies (TA-GEM/HSGYAD/15/A02/P02/58).

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

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

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

References

- Akkan HA and Karaca M. (2003). Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı. *YYÜ Vet Fak Derg.* 14 (2), 72-77.
- Baer A and Kehn-Hall K. (2014). Viral concentration determination through plaque assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *J O V E.* 93, 1-10.
- Berg G, Harris E K, Chang S L, Busch K A. (1963). Quantitation of viruses by the plaque technique. *J Bacteriol.* 85, 691-700. 1963.
- Campos C O, Bernuci M P, Vireque AA, Campos J R, Silva-de-Sa M F, Jamur M C, and Rosa-e-Silva ACJS. (2012). Preventing microbial contamination during long-term in vitro culture of human granulosa-lutein cells: an ultrastructural analysis. *ISRN Obstetrics and Gynecology.* Vol. 2012, Article ID 152781, 6 pages.
- Çokçalışkan C, Türkoğlu T, Sareyyüpoğlu B, Uzunlu E, Babak A, Özbilge BB, Gülyaz V. (2016). Qs-21 enhances the early antibody response to oil adjuvant foot and mouth disease vaccine in cattle. *Clin. Exp. Vacc. Res.* 5:138-147.
- Doronin MI, Timina AM, Lozovoy DA, Starikov VA, Mikhailishin DV, Medvedeva NN, Borisov AV. (2018). Method for fmd virus 146S component concentration determination with real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in vaccine raw materials. *Vet Science Today.* 2 (25).
- Egerbacher M, Edinger J, Tschulenk W. (2001). Effects of enrofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride on canine and equine chondrocytes in culture. *Am J Vet Res.* 62(5), 704-708.
- Fleckenstein E, Uphoff CC, Drexler HG. (1994). Effective treatment of mycoplasma contamination in cell lines with enrofloxacin (Baytril). *Leukemia.* 8(8),1424-1434.
- Freshney R.I. (2005). *Culture of Animal Cells. A manual of basic technique/Fifth Edition.*
- Gunetti M, Castiglia S, Rustichelli D, Mareschi K, Sanavio F, Muraro M, Signorino E, Laura Castello 1, Ferrero I, Fagioli F. (2012). Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102W device, an alternative practical approach for cell counting. *Journal of Translational Medicine.* 10:112
- Grubman MJ and Baxt B. (2004). Foot and mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(2), 465-493.
- Holst-Hansen C, Brünner N. (2000). Cell and tissue culture and associated techniques. *Cell Biology 1, Julio E. Celis (eds), Academic Press*
- Hu JF, Gilmer L, Hopkins R, Wolfenbarger L Jr. (1989). Effects of antibiotics on cellular viability in porcine heart valve tissue. *Cardiovascular Research.* 23(11), 960-964.
- Jamal SM and Belsham G J. (2013). Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res.* 44, 116.
- Lim S, Hossain MA, Park J, Choi SH, Kim G. (2008). The effects of enrofloxacin on canine tendon cells and chondrocytes proliferation in vitro. *Vet Res Commun.* 32, 243-253.
- Liu B, Cui Y, Brown PB, Ge X, Xie J, Xu P. (2015). Cytotoxic effects and apoptosis induction of enrofloxacin in hepatic cell line of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish&Shellfish Immunology.* 47(2), 639-644.
- Naughton GK, Eisinger M, Bystryjn JC. (1983). Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo, *J Exp Med.* 158, 246-251.
- Nawaz Z, Siddique A B, Zahoor M A, Bilal Aslam et al., 2019. Detection of foot and mouth disease virus shedding in milk of apparently healthy buffaloes and cattle of Punjab, Pakistan. *Bufalo Bulletin,* 38(2), 255-261.
- Or ZS and Fidancı UR. (2009). Şap virüsü ile enfekte ve aşılanalarda serum proteinlerinin elektroforetik dağılımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 56, 13-18.
- OIE, (2017). *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Terrestrial manual: Foot and mouth disease: OIE terrestrial manual, Chapter 3.1.8.(May),433-464.*
- Sareyyüpoğlu B, Gülyaz V, Çokçalışkan C, Ünal Y, Çökülgen T, Uzunlu E, Gürcan S, İlk O (2019). Effect of FMD vaccination schedule of dams on the level and duration of maternally derived antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol. Vol:* 217
- Perlman D. (1979). Use of antibiotics in cell culture media. *Cell Culture Methods In Enzymology.* 58, 110-116.
- Reeves P T. (2012). *Antibiotics: groups and properties. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, First Edition. John Wiley & Sons, Inc.*
- Saran B and Karahan ZC. (2010). Ürolojide antibiyotik kullanımı-antimikrobiyal ajanlara genel bakış. *Türk Urol Sem.* 1, 216-220.
- Spier RE and Griffiths JB. (1985). *Animal Cell Biotechnology. Academic Press.*
- Uphoff CC and Drexler H.G. (2002). Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 38(2):86-9.
- Uphoff CC, Denkmann SA and Drexler HG. (2012). Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with plasmocin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology. Article ID 267678, 8 pages. DOI:10.1155/2012/267678.*
- Yarsan E. (2012). Veteriner hekimlikte antibiyotikler: antibiyotiklere direnç ve direncin çok yönlü etkileri. [tvhb.org.tr > wp-content > uploads > 2019/03 >](http://tvhb.org.tr/wp-content/uploads/2019/03/)
- Xiao Y, Chen HY, Wang Y, Yin B, Lv C, Mo X, Yan H, Xuan Y, Huang Y, Pang W, Li X, Yuan Y A and Tian K. (2016). Large-scale production of foot-and-mouth disease virus (serotype Asia1) VLP vaccine in *Escherichia coli* and protection potency evaluation in cattle. *BMC Biotechnology.* 16:56



Gıda ve yem mikrobiyoloji laboratuvarlarında seçilmiş riskler ile risk kaynaklarına ilişkin kontrol mekanizmaları

Nuray Gamze Yörük¹, Erdem Danyer²

¹ Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Mikrobiyoloji ve Seroloji Birimi, Kocaeli, Türkiye

² Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 12.09.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 26.05.2020

Özet: Risk, bir kurumun kuruluş amaçları ile stratejik amaç ve hedeflerine ulaşmasına, temel faaliyetlerinin yerine getirilmesine engel olabilecek veya beklenmeyen zararlara yol açabilecek durum ya da olaylardır. ISO / IEC 17025 Test ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar Standardının 2017 yılı revizyonunda risk belirlenmesi, laboratuvar kalite yönetiminin bir parçası olmuştur. Bu çalışmada, gıda ve yem analizlerinin yapıldığı bir mikrobiyoloji laboratuvarında muhtemel riskler ve etkilerinin belirlenmesi ile risk değerlendirme skorlarına göre aksiyon alınmasına ilişkin çalışma anlatılmıştır. Tespit Edilen Riskler; Strengths (Güçlü Yönler), Weaknesses (Zayıf Yönler), Opportunities (Fırsatlar), Threats (Tehditler) faktörlerinin belirlendiği SWOT analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Ardından, değişen faaliyetlere ve olaylara bağlı olarak belirli zaman aralıklarında risklerin etki ve olasılıkları gözden geçirilerek risk skorları hesaplanmıştır. Risk skorunda elde edilen sonuçlara göre riskin türü, risklere verilecek cevaplar, açıklamalar ve alınacak ek önlemler ile risk eylem planlarının yapıp yapılmayacağı belirlenmiştir. Risk değerlendirmesi, 1-5 puan arasındaki risk olasılığı ile risk şiddetinin çarpımı sonucunda elde edilen 1-25 puan arasındaki risk skoru puan skalası üzerinden denk gelen sayıya göre hesaplanmıştır. Araştırma sonucunda, eski ve yeni sistem ile çalışan laboratuvara ait risk puanları sırasıyla 9.84±0.55 ve 4.92±0.27 puan olarak belirlenmiştir (p<0,05). Risk değerlendirmesinin uygun ve etkin bir şekilde yapıldığı zaman laboratuvarın gelişmesine katkı sağladığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: ISO 17025, risk değerlendirmesi, risk etkisi, risk skoru, SWOT analizi

Control mechanisms about selection risk with risk resources in the food and feed microbiology laboratories

Abstract: Risk is a situation or event that may result in unexpected harm, or may prevent an organization from reaching their founding purposes, strategic goals, and targets, and fulfilling their main operations. Risk assessment and identification of opportunities were a part of laboratory quality management in the 2017 revision of the General Requirements for the adequacy of ISO / IEC 17025 Test and Calibration Laboratories. This study is to describe the possible risks and their impact, uncovering opportunities on food and feed microbiology laboratories and to take action according to risk assessment scores. Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats, or SWOT analysis were used to assess the risks identified. Then, risk scores were calculated by reviewing the effects and possibilities of risks at certain time intervals depending on the changing activities and events for the risks. According to the results obtained in the risk score, it was determined whether the risk action plans will be made with the type of risk, the answers to the risks, explanations and additional measures to be taken. For this purpose, determined risks should first be evaluated. For evaluated risks, the impact and probability of risks should be reviewed and risk scores should be calculated in certain time intervals depending on changed activities and events. According to results of risk scores (1-25), it should be determined whether risk action plans will be made with the risk type, risk responses, remarks and additional measures to be taken. In the result of this study, risk assessment has been performed according to the risk score, a number between 1-25 on a score scale obtained from the multiplication of a risk probability value between 1-5 points and the risk impact. As a result of the research, the risk score of the laboratory working with the previous system 9.84±0,55 and 4.92±0.27 new system was determined as and point respectively (p<0.05). It is thought that when the risk assessment is done properly it will contribute to the development of the laboratory.

Key words: ISO 17025, risk assessment, risk impact, risk score, SWOT analysis

Giriş

Laboratuvar testlerinin doğruluğu ve güvenilirliği, analizler ve hizmetler alanında hizmet alacak kişi/kişiler/firmalar tarafından karar vermede önemli bir rol oynar. Bu testler, özellikle, analitik öncesi, analitik

dönem ve analitik sonrası aşamalara dayanmakta, ilgili işlemlerin detaylı bir şekilde yapılması ve bunlar için nasıl aksiyon alınması gerektiğinin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle, ISO 17025: 2017 (ISO 2017) ile ISO 31000:2018 (ISO 2018) gereklilikleri,

Yazışma adresi / Correspondence: Nuray Gamze Yörük, Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Mikrobiyoloji ve Seroloji Birimi, Kocaeli, Türkiye E-posta: nuraygamzeyoruk@gmail.com

ORCID IDs of the authors: 10000-0003-0867-4141 • 10000-0002-7922-7384

risk yönetimi araç ve prosedürlerinin kullanımına uyulmasını tavsiye etmektedir (Vasilnakova 2014).

Laboratuvarlarda her aşamada çeşitli risklerle karşı karşıya kalınmaktadır. Güvenilir test sonuçları elde etmek için tüm adımlarda tam hata tespiti ve buna yönelik önlemler gerekir (Vasilnakova 2014; Neogi ve ark. 2016).

Özellikle, mikroorganizmalarla etkileşime giren laboratuvarlar, patojenlerin kullanımına bağlı olarak bazı potansiyel risklere sahiptir. Biyogüvenlik ve biyogüvenliğin tanınmasını arttıracak emniyet yönetim sistemi, tehlike olasılığını önlemek ve patojenle uğraşan araştırmacıların güvenliğini sağlamak için kurulmalı ve uygulanmalıdır (Lee ve ark. 2014).

Risk, gelecekte meydana gelebilecek bir olayın istenmeyen sonuçlara yol açabileceği varsayımına dayanmaktadır. Herhangi bir risk yönetimi sürecinin nihai amacı, riskleri tanımlamak, değerlendirmek, hafifletmek ve/veya ortadan kaldırmaktır (Vasilnakova 2014).

Risk yönetimi, tehlikelerden doğabilecek risklerin belirlenmesi ve bunların ortaya çıkışını önlemeye yönelik bir erken uyarı sistemidir (Uslu 2016). Risk yönetiminin başta gelen hedefleri laboratuvarların tümünü kapsayan bir uyum içinde, zararlara mani olma faaliyeti ve düzeltici aktivitelerden oluşmalıdır (Griffin 2011; Uslu 2016). Bu sistem sayesinde laboratuvar çalışanları, laboratuvarın tüm sistemi ile numuneler için olası riskleri azaltılmakta ve böylece güvenli bir ortam oluşturulmaktadır.

Risk yönetimi kritik noktaları belirleyebileceğimiz çeşitli aşamalardan oluşmaktadır (Rejda 2010). Bu aşamalar aşağıda belirtilen başlıklar altında tanımlanabilir:

a) Tehlike olasılığı ve buna bağlı oluşabilecek risklerin belirlenmesi: Tehlike unsurlarının oluşabileceği muhtemel riskler belirlenir ve bu riskleri içeren risk grupları listelenir.

b) Belirlenen risklerin analizi veya değerlendirilmesi: Riskler belirlenip, tanımlanarak risk analizleri risk değerlendirme matrisi ile gerçekleştirilir. Risk analizi ile riskin şiddeti ortaya koyulur. Risk tespitinin yapılmasıyla risklerden her birine tehlike değeri verilmelidir. Bunun için risk hesaplamasında; riskle karşılaşma ihtimali, karşılaşma sıklığı, karşılaşabilecek bireyler ya da analizler ile gerçekleşme ihtimali fazla olan risk kaynağı tespit edilir.

Yapılan değerlendirmelerin sonunda riskler yüksek önem derecesinden düşük önem derecesine doğru sıralanır (SWOT analizi). Gerçekleşme ihtimali fazla ve meydana getirebileceği zararı yüksek olan

risk/riskler kritik önem derecesinde sayılarak çözüme gidilir.

c) Riskleri değerlendirme sistemleri veya metotlarının belirlenmesi: Burada risk kontrol ve risk finansmanı stratejileri genellikle bir arada çalıştırılmaktadır. Risk kontrolünün sağlanması ile risklerin önlenmesi ve/veya etkisinin azaltılması mümkündür. Risk kontrolü; riskin kabullenilmesi, riske girmeme, kayıpların önlenmesi veya en aza indirilmesini içermektedir (Aksay ve ark. 2003).

d) Riske karşı uygulama: Belirlenen risklere karşı uygun olan stratejilerin gerçekleştirilmesidir.

e) Kontrol ve denetimlerin takibi: Bu aşamada uygulanan analizler her basamakta kontrol edilerek, sonuçları değerlendirilmektedir (ECRI 2003).

f) Geri bildirim ve hataları giderme: Yapılan risk analizleri sonucunda, risk yönetimi süreci planlanan zamanlarda sürekli kontrol edilerek, geri bildirim yöntemiyle gerekli düzenlemeler veya iyileştirmeler uygulanmalıdır. Risk analizi süreci, tespit edilmiş risk/riskler ile ilgili kayıpların etkisini ve sıklığını ortaya koyan çalışmaları içeren süreçtir (ECRI 2003; Griffin 2011; Uslu 2016).

Bu çalışmada, gıda ve yem numunelerinin çalışıldığı mikrobiyoloji laboratuvarlarında karşılaşılabilecek riskler ve etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, laboratuvarın belirlenmiş olan bu risklerle risk analizi yapılmadan önceki işleyişi ile risk analizi yapıldıktan sonraki işleyişinin, risk değerlendirme skorlarına göre karşılaştırılması, risklerin önlenmesi ve/veya ortadan kaldırılmasına yönelik yapılması gereken çalışmalar yürütülmüş, hesaplamalar yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, risklerin yönetilmesi sonucunda oluşacak olumlu etkileri ile sağlayabileceği olası kazançları olan fırsatlarda belirlenerek sunulmuştur.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada, gıda ve yem numuneleri çalışan mikrobiyoloji laboratuvarları için risk teşkil edebilecek tüm durumlar tek tek tanımlanarak, tehlikeler belirlenmiş ve 25 maddeden oluşan bir risk analizi değerlendirme yapılmıştır. Çalışmanın anlaşılabilir olması ve sadeleşmesi için sadece müdahale ile değişiklik görülen 13 adet risk bu çalışmaya konu edilmiştir. Bu araştırmada, laboratuvarında oluşması muhtemel riskler SWOT analizi yapılarak listelenmiş olup, risk analizleri için laboratuvarın daha önceden risk faktörleri hesaba katılmaksızın yapılan risk analizi sonuçları ile risk faktörleri ve yapılacak çalışmalara yön verildikten sonraki analiz sonuçlarının Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) Risk Değerlendirme

kriterlerine göre yorumlanmasına yer verilmiştir. Laboratuvarlarda yapılan çalışmada ISO 31000:2018 (ISO 2018) ve ISO 31010:2017 (ISO 2017) standart-

ları temel alınarak kullanılan risk değerlendirme kriterlerinin ortaya çıkma olasılığı/etkisinin kriterleri Tablo-1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Risk Değerlendirme Kriterleri Ortaya Çıkma Olasılığı (İhtimal)/ Yarattığı Etki (Şiddet) (Eurolab 2017).

Derecesi (Puanı)	Olasılık	Etki
Çok Yüksek (5)	Riskin ortaya çıkma olasılığı çok yüksek (%80-%100)	15 (Risk Şiddeti 5, olasılığı 3 olan risklerde risk skoru 15 ise yüksek risk (önemli risk) olarak değerlendirilecektir.), 16 ve 20 olan risklerdir. Riskin oluşması durumunda sonuçta yıkıcı olumsuz etki vermesi, faaliyetlerin durdurulma gereksiniminin doğması. Maddi kayıplar olabilir. Ek kontrol faaliyetleri belirlenmelidir.
Yüksek (4)	Riskin ortaya çıkma olasılığı yüksek (% 51-%79)	Risk skoru 12 (Risk şiddeti 4 ve olasılığı 3 olan risklerin skoru 12 ise yüksek risk (önemli risk) olarak değerlendirilecektir.), Risk oluşması, Stratejik ve birim hedeflerine ulaşmada yüksek düzeyde olumsuz etkisi olabilir. Birim süreçleri olumsuz etkilenir. Maddi kayıplar olabilir. Ek kontrol faaliyetleri belirlenmelidir.
Orta (3)	Riskin ortaya çıkma olasılığı ancak belirli durumlarda gerçekleşebilir (%50)	Risk skoru 8, 9, 10, 12 ve 15 olan risklerdir. Orta düzey risklerin etkilerini düşürmek için faaliyetler başlatılmalıdır. Riskin oluşması Stratejik ve birim hedeflerine ulaşmada ve hizmetlerin sunulmasında belirli düzeyde etkisi olabilir. Risk azaltma önlemleri zaman alabilir. Ek kontrol faaliyetleri belirlenmelidir.
Düşük (2)	Riskin ortaya çıkma olasılığı düşük. (%20-%49)	Risk skoru 3, 4, 5 ve 6 olan risklerdir Riskin oluşması süreçlerde hafif olumsuz etki oluşturabilir. Süreç performansında çok az düşme olabilir. Ek kontrol faaliyetleri belirlenebilir.
Çok Düşük (1)	Riskin ortaya çıkma olasılığı yok denecek kadar azdır. (%1-%19)	Risk skoru 1 ve 2 olan risklerdir. Çok düşük risklerde süreç devam ettirilir. Riskin oluşması halinde sistem performansı dikkate değer düzeyde etkilenmez. Mevcut kontrol faaliyetleri ile sürece devam edilmelidir.

Tablolar, risk öncelik puanlarının, potansiyel hata etkileri ve yapılacak iyileştirme faaliyetleri sonrasında yapılan iyileştirme oranlarını görebilmek amacıyla, bütünselliği sağlamak açısından, literatürle de uyumlu şekilde tek bir parça halinde verilmiştir.

Laboratuvarlardaki tüm bu değerlendirmelerin yapılmasında ise en önemli süreçlerden olan gerek reaktif ve gerekse proaktif dönemde risk unsurları açısından tehlikeli olabilecek bileşenleri içerisinde barındıran laboratuvar sürecine yönelik olarak Pillay ve Wang (2003)'ün belirttiği şekilde FMEA çalışması yapılmıştır. FMEA çalışması genellikle beş adımdan oluşmaktadır. Bunlar;

1. Riske konu olan kaynağın ve kaynağa ait sürecin belirlenmesi: FMEA uygulanacak kaynağa ait risk şiddeti yüksek sürecin belirlenmesidir.

2. FMEA çalışmasının yapıldığı laboratuvar ortamı/personeli: FMEA için, çeşitli analiz yöntemlerinin kullanıldığı çeşitli laboratuvar ortamı (risk unsurları göz önüne alınmadan önce ve sonra) ya da personelinin belirlenmesi gerekmektedir.

3. FMEA yapılmasına konu olan kaynağa ait sürecin grafik olarak sunumu: Sürecin işletilmesine dair akış diyagramının belirlenmesidir.

4. FMEA analizi aşaması: FMEA çalışması sırasında listelenen hata çeşitlerine yönelik olarak FMEA çalışmasında bulunan ekip muhtemel her hata türünü gözden geçirerek oluşabilecek hataların potansi-

yel etkilerini belirler. Hata türü belirlendikten sonra hata türünün şiddet, olasılık ve fark edilebilirliğinin, olası nedenleri ile birlikte genellikle karar ağacı kullanılarak bulunması aşamasıdır.

5. Aksiyon alma ve analiz sonuçlarının hesabı: Elde edilen verilere göre bir plan dâhilinde problem çözümüne yönelik hedefler ortaya koyulması, yüksek riskli olan hata türlerinin ortadan kaldırılması veya azaltılması için hareket tarzının belirlenmesidir. Hedef olarak temelde risk oluşturabilecek hata türleri komple ortadan kaldırılmaya çalışılmalıdır (Mc Dermott ve ark. 2009). Çalışmada değerlendirilen riskler aşağıda sıralanmıştır.

1. Personel Kaynaklı

Laboratuvarlar yüksek sağlık riski barındıran tehlikeli ve riskli ortamlardır. Laboratuvar güvenliğinin sağlanması için çalışma alanlarında ve takip eden süreçlerde personelin karşılaşabileceği risklerin kontrolü ve bertaraf edilmesi gerekmektedir. Laboratuvar içinde görev alan her çalışanın, öncelikli laboratuvar güvenliği hakkında bilgi sahibi olması, karşılaşabileceği potansiyel tehlike ve risklere karşı duyarlı olması, acil durumlarda neler yapması gerektiğini bilmesi ve kurallara dikkatle uyması gerekmektedir. Koruyucu çalışma uygulamaları benimsenmeli ve kişisel koruyucu ekipmanlar çalışma esnasında muhakkak kullanılmalıdır. Bu ekipmanlar gözlük, maske, eldiven ve iş önlüğü gibi donanımlardır. Saçlar dağı-

nık ve çalışmaya mani olmamalıdır. Çalışma bitiminde her materyal, cihaz ve aletler uygun yöntemlerle temizlenip kaldırılmalıdır. Standartlara uygun giysiler seçilmeli (önlük, galoş, terlik vb.), laboratuvar çalışma alanında yiyecek ve içecek bulundurulmamalıdır. Numuneler ya da reaktifler potansiyel bulaşma kaynağı olarak görülmeli çalışma sırasında örnek ve reaktiflerle direkt temastan kaçınılmalı, eldiven kullanılmalıdır, direkt temas sonrasında eller muhakkak uygun temizleyiciler ile yıkanmalıdır. Analizlerin gerçekleştirildiği kısımlar laboratuvar personelinin hareketini engellemeyecek şekilde ergonomik olarak tasarlanmalıdır. Tezgâh ve yüzeyler kirli alanlar olarak kabul edilmeli, bunlarla temas halinde eller dezenfektanlarla dezenfekte edilip yıkanmalıdır. Bu düzenlemelerin amacı tüm çalışanların güvenli bir iş ortamında çalışmasının sağlanması ile doğru ve güvenilir sonuçları olan analizleri gerçekleştirmektir. Bununla birlikte güvenliğin laboratuvar üst yönetiminden işçisine kadar herkesin sorumluluğunda olduğu unutulmamalıdır (ECRI 2003; Uslu 2016).

Yeterli personel ile iş yükünün orantılı paylaşımı ile hizmette kalite sağlanmalı ve aktif bir hata bildirim sistemi geliştirilmelidir. Laboratuvar teknik personeli, ortaya çıkabilecek her türlü hata ve bunlara bağlı meydana gelebilecek riskleri azaltmak için yalnızca mesleki görevlerini yerine getirmelerinden sorumlu tutulmalıdır. Stres, hataların belli başlı sebepleri arasında sayıldığından, stres kaynakları tespit edilmeli ve strese yol açan etkenleri minimize edecek tedbirler hayata geçirilmelidir (Özata ve Altuncan 2010).

2. Laboratuvar Kaynaklı

Analiz süresince uygulanan kalite çalışmaları içerisinde laboratuvar süreçleri de yer almaktadır. Bu süreçte temel hedef doğru, güvenilir ve kesin laboratuvar sonuçlarının zamanında hizmet alanlara sunulabilmesidir. Aşağıda belirtilen bu süreçlerden herhangi birinde ortaya çıkabilecek bir problem kaçınılmaz olarak test sonuçlarında hatalara yol açmaktadır. Laboratuvar hataları, numunelerde hangi analizin isteneceğinden sonuçların rapor edilip, uygun olarak yorumlanmasına kadar olan süreçte meydana gelen eksiklik ya da kusur olarak tanımlanabilir. Yapılan farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar laboratuvar hatalarının dağılımının; analiz öncesi evre %46-68, analiz evresi %7-13, analiz sonrası evre %18-47 olarak belirtmektedir (Uslu 2016). Gıda/yem mikrobiyolojisi laboratuvarlarında analize ait numunelerin değerlendirilmesi oldukça karmaşık bir yöntem olup çok yönlü bir yaklaşım gerektirir. Laboratuvar süreci belli başlı üç kısımdan oluşur (Bolayırılı 2013).

2.1. Analiz Öncesi Süreç

Bu aşamada numunenin kabulü, sıcaklık derecesi ölçümü ya da etiket bilgilerindeki ısıyla uyum sağlayıp sağlamadığının kontrolü, geliş saati, orijinal ambalaj olup olmadığı, steril kap ya da ambalajlarla transferin gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği, numuneye ait analiz isteklerinin yapılması, etiketlenmesi, numunelerin toplanması ve ilgili laboratuvara uygun koşullarda ulaştırılmasını içerir. Hata/hataların sıklıkla karşılaşıldığı aşamadır. Bu aşamada karşılaşılabilecek hataların yüksek oranda oluşma ihtimali ve kontrolü laboratuvar personeline bağlı olan bir durum değildir. Bu evrede görülebilen başlıca sorunlar; analiz taleplerinde ve numune tanımlanmasında yapılan hatalar, uygun olmayan (laboratuvara ulaştırıldığında numunenin mikrobiyolojik analizler için uygun ısıda olmaması, çatlak ya da sızıntılı bir ambalaj ile getirilmiş olması vb.) numune alımı, numunelerin steril olmayan kaplarda olması ya da orijinal ambalajın delik, çatlak, patlamış olduğunun farkına varılmadığı durumlardır. Ayrıca, numunelerin istenilen analizler için yeterli miktarlarda olmaması ile istenilen zaman dilimlerinde laboratuvara ulaştırılmamış olması (süt ve su analizleri için alınan örneklerin en fazla 6 saat içerisinde, diğer gıda/yem örneklerinin ise 72 saatlik zaman diliminde laboratuvar tarafından analize alınmış olması gereklidir) ve numunelerin uygun olmayan koşullarda laboratuvara ulaştırılması gibi (soğuk zincir, etiket bilgilerindeki sıcaklık derecesi vb.) durumlardır (ISO 17728:2015).

2.2. Analitik Süreç

Mikrobiyolojik analizler için laboratuvara ulaştırılan numunelerin işlenmesi evresinde başlıca hata kaynakları; mikrobiyoloji laboratuvarı ortam şartları ve personelin hijyen kurallarına dikkat etmemesi, mikrobiyoloji laboratuvarında besiyeri hazırlanması sırasında dikkat edilmesi gereken kurallara riayet edilmemesi (sterilite, uygun hacim, otoklavlama, pH kontrolü), donanımın (otomatik pipet, terazi gibi) günlük, haftalık, aylık bakım programlarının yapılmaması, zamanında ölçümleme yapılmaması, yetersiz hacimde numune kullanılması, çalışma için gerekli ortam şartlarının sağlanmaması (sıcaklık, nem, havalandırma, sterilite), referans ve çalışma kültürü takiplerinin gerektiği şekilde yapılmaması, çalışma öncesi ve esnasında iç kalite kontrol takibinin etkin olarak gerçekleştirilmemesi, yeterlilik testlerine katılımda eksiklik veya hiç katılmama dolayısı ile laboratuvarın çalışma profili hakkında bir sonuca varamama, miadı geçmiş malzeme kullanılması, analizlerin güvenilirliği ve güncelliğinin takip edilerek, doğru-güvenilir sonuç verilmemesi (Ulusal /Ulusallararası stan-

dartlar/ilgili rehber ya da kaynaklar vb.), test prosedür veya talimatlarına uyulmaması, mikrobiyoloji laboratuvarında kilit personelle alakalı yetkinlik ve akreditasyon analizlerinin gerçekleştirilmeden analizlere katkı sağlaması (deneyimsiz personel), analiz sonuçlarının kayıt altına alınmaması ya da unutulmasıdır (Türk 2012).

2.3. Analiz Sonrası Süreç

Analiz işlemleri tamamlandıktan sonra pozitif çıkan sonuçların izolasyon ve identifikasyonu, doğrulanması, onaylanması, sonuçların numune kabul birimi sistemine elektronik olarak ulaştırılması, rapor edilmesi ve sonuçların laboratuvar müdürü tarafından değerlendirilerek, onaylanması aşamalarını içerir. Analiz sonrası dönemdeki amaç, sonuçların doğru ve güvenilir bir biçimde, beklenen zaman diliminde raporlanmasıdır. Bu evrede görülebilecek başlıca hata kaynakları; gecikmiş ya da hiç rapor edilmemiş sonuçlar, elle yazılan sonuçlarda yapılabilecek hatalar, mikrobiyoloji ve numune kabul birimleri arasındaki iletişim sorunları, sonuçlarda uygunluk değer-

lendirmelerinin yapılmaması ya da yanlış yapılması veya gerekli standart/yönetmelik/ilgili kit prosedürüne göre yapılmamış olması olabilir.

Çalışmada göz önüne alınan hata kaynakları personel, laboratuvar ve analiz bazında değerlendirilmiştir. FMEA analizinde, Şiddet (Ş), Olasılık (O) ve Risk Skorunun (E) belirlenmesi ve değerlendirilmesinde FMEA analizine katılan laboratuvar ekibi tarafından belirtilen hesaplamalardan faydalanılmıştır (Reid 2005).

Hatalara verilen toplam risk puanlarına bağlı değişimlere ait iki eş arasındaki farkın skorları Wilcoxon İstatistiki Önemlilik Testi ile değerlendirilmiştir (p<0,05).

Bulgular

Yapılan değerlendirmelerde tespit edilen riskler ve sebepleri, mevcut kontroller, riskleri iyileştirmek için yapılan çalışmalar ve bu çalışmalara ilişkin açıklamalar ile iyileştirme çalışmaları sonucunda kazanılacak fırsatlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Tespit edilen riskler ve yapılan müdahalelere ilişkin bilgiler.

Sıra	Tespit Edilen Risk ve Sebep	Mevcut Kontroller	Açıklamalar (İzleme Raporlama) / Fırsatlar
1 ^a	Risk: Uygun olmayan numunenin gönderilmesi ile yanlış ve hatalı sonuç bildirimi. Sebep: Hatalı numune tanımı, numunelerin yanlış etiketlenmesi ve gönderilmesi, yanlış örnekleme, hatalı analiz talepleri.	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, gerekli formların tutulması. Gerekli noktalarda sürekli takip ve gerekli birimlere eğitim yapılması.	Etkin bir şekilde Numune Kabul Prosedürünün oluşturulması veya mevcut prosedürün revizyonunun yapılması, Uygun Olmayan Numunenin Reddi Formunun işletilmesi, Numune Kabul Prosedürünün müşteri tarafından güncel olarak bilinirliğinin sağlanması. / Müşteriye sunulan hizmet sürecinin kontrollü bir şekilde yürütülmesi sonucunda müşteri memnuniyetinin artırılması.
2 ^a	Risk: Uygun olmayan numunenin kabul edilerek analize alınması ile yanlış ve hatalı sonuç bildirimi. Sebep: Uygun olmayan numune alınımının yapılmış olması, uygun olmayan nakliye ve numune kabulün bu durumu fark etmeden numuneyi analize göndermesi.	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, gerekli formların tutulması. Gerekli noktalarda Sürekli takip ve birbiri ile kontrollü uygulamaların yapılması.	Etkin bir şekilde Numune Kabul Prosedürünün oluşturulması veya mevcut prosedürün revizyonunun yapılması, Uygun Olmayan Numunenin Reddi Formunun işletilmesi, Numune Kabul Prosedürünün müşteri tarafından güncel olarak bilinirliğinin sağlanması. / Müşteriye sunulan hizmet sürecinin kontrollü bir şekilde yürütülmesi sonucunda müşteri memnuniyetinin artırılması ile itibar artışı.
3 ^a	Risk: Talep edilen analizlerin numunenin fiziksel koşullarına bağlı olarak laboratuvar tarafından gerçekleştirilememesi, itibar kaybı. Sebep: Numunelerin laboratuvara getirilirken orijinal ambalajının veya sterilitesinin bozulması (soğuk zincir, etiket bilgilerindeki ısı derecesi v.b.).	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, gerekli formların tutulması. Gerekli noktalarda gerekli kişiler tarafından sürekli birbirini kontrol eden kişi ve sistemlerin takibinin yapılması.	Etkin bir şekilde Numune Kabul Prosedürü veya mevcut prosedürün revizyonunun yapılması ve Uygun Olmayan Numunenin Reddi Formunun işletilmesi, Numune Kabul prosedürünün müşteri tarafından güncel olarak bilinirliğinin sağlanması. / Müşteriye sunulan hizmet sürecinin kontrollü bir şekilde yürütülmesi sonucunda müşteri memnuniyetinin artırılması ile itibar artışı.
4 ^a	Risk: Beklenenden daha fazla/ az mikroorganizmanın üremesi ile yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçların verilmesi. Sebep: Numunelerin istenilen zaman dilimlerinde laboratuvara ulaştırılmaması (süt ve su analizleri için alınan örneklerin en fazla 6 saat içerisinde, diğer gıda/yem örneklerinin ise 72 saatlik zaman diliminde laboratuvar tarafından analize alınmış olması gereklidir)	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, gerekli formların tutulması. Kritik süreçler ile noktaların sürekli takibi ve kritik kişilere işin önemi noktasında eğitim verilmesi.	Numune Kabul Prosedürünün müşteri tarafından güncel olarak bilinirliğinin sağlanması, Uygun Olmayan Numunenin Reddi Formunun işletilmesi, yapılması elzem olan, acil vakalar için zorunlu olan durumlarda (jandarma, savcılık, polis kanalıyla gelen numuneler) rapora numune hakkında beyan düşülmesi / Müşteriye sunulan hizmet sürecinin kontrollü bir şekilde yürütülmesi sonucunda müşteri memnuniyetinin artırılması.

Sıra	Tespit Edilen Risk ve Sebep	Mevcut Kontroller	Açıklamalar (İzleme Raporlama) / Fırsatlar
5 ^a	<p>Risk: Yanlış analiz sonucu hesaplamaları, yanlış pozitif/negatif sonuçların verilmesi, yanlış kayıt tutulması ya da unutulması.</p> <p>Sebep: Mikrobiyolojik analizler için uygun olmayan analist (kimyager, kimya mühendisi, orman mühendisi, v.b), personelin dalgın, üzgün, stresli olması, yeterli eğitim almamış, yetkin veya akredite olmayan analist</p>	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak laboratuvar birimine uygun olan kişilerin analist olarak seçilmesi gerekli formların kritik kişiler tarafından düzenli olarak tutulması. Analistlerin yaptıkları iş ve takibi ile alakalı olarak ilgili formları tutarak kayıt altına almalarının sağlanması. Gerekli görülen her noktada yetkin/yeterli kişiler tarafından eğitim verilmesi.	Laboratuvar Müdürlüğü Çalışanları Görev Tanımları Prosedürü, Personel Yeterliliği ve Eğitimi Prosedürü, Personel Oryantasyon Planı, Yetkinlik Eğitim Planı, Yıllık Eğitim Planı, Personel Eğitim Değerlendirme Formlarının tam olarak yerine getirilmesinin sağlanması, laboratuvarın ilgili bölümüne uygun analistin belirlenmesi, gerekli eğitim ve uygulamaların yaptırılarak yetkin/yeterli olup olmadığının kontrolü. Personellerin motivasyon kaybını engelleyen, yapılan iş ile alakalı formların her adımda takip sistemi ile devam ettirilmesi. / Personellerin yetkinliğinin izlenmesi ile bireysel performanslarında artış sağlanarak laboratuvar performansının (analiz sayılarının, analiz çeşitliliğinin ve araştırma faaliyetlerinin) artırılması.
6 ^a	<p>Risk: Uygun olmayan ortam koşulları ve analizler için hijyenik olmayan personel ile mikrobiyolojik analizlerin çalışılması ve doğru olmayan analiz sonuçlarının verilmesi.</p> <p>Sebep: Hijyenik olmayan personel (kişisel hijyene özen göstermeme, terlik/galoş kullanılmaması, önlük giyilmemesi, eldiven takma prensibi olmaması ve tek yönlü akışa dikkat edilmemesi, v.b). Laboratuvarın analizler için uygun olmayan ortam koşulları (ısı, hijyenik olmayan yüzey alanları, steril olmayan ekipman)</p>	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, gerekli formların her adımda kritik kişiler tarafından tutulması. Kişilerin hijyen kurallarına uymaları ile alakalı performans formlarının günlük olarak tutulması.	Mikrobiyoloji Ortam Şartları Talimatı, Mikrobiyoloji Sterilizasyon Talimatı, Ortam Şartları Takip Formu uygulamalarının disiplinli bir şekilde yerine getirilmesi. / Deney sonuçlarının doğruluğunun güvence altına alınması sonucunda müşteri memnuniyetinin korunması ve artırılması.
7 ^a	<p>Risk: Mikrobiyoloji Laboratuvarında analiz sonuçlarında olacak yanlışlıklar, geriye dönük işlem yapılmaması</p> <p>Sebep: Mikrobiyoloji laboratuvarında besiyeri hazırlanması (sterilite, uygun hacim, otoklavlama, pH kontrolü v.b.) kaynaklı analiz sonuçlarında olacak yanlışlıklar ve bu yanlışlıklar için geriye dönük işlem yapılamaması.</p>	Mikrobiyoloji laboratuvarında besiyeri hazırlanması ve hazırlık esnasında dikkat edilmesi gerekenlere yönelik prosedür ve talimatlara uyularak, gerekli formların tutulması ve kritik süreçlerde gereken kontrollerin yapılması.	Besiyeri Hazırlama Talimatı Su Kalite Kontrol Formu (suyun pH'sı, toplam Cl, ağır metal varlığı, toplam canlı sayısı) ve Otoklav Kontrol Formlarının etkin bir şekilde kullanılması / Her adımda yapılan kontroller ile daha ekonomik daha kaliteli elde edilmiş besiyeri kullanımı, daha az maliyet. Deney sonuçlarının doğruluğunun güvence altına alınması sonucunda müşteri memnuniyetinin korunması ve artırılması.
8 ^a	<p>Risk: Anlık arıza durumlarında analizin gerçekleştirilemeyerek sonuç verilememesi, itibar kaybı</p> <p>Sebep: Zamanında ölçümleme yapılmaması, beklenmeyen cihaz/donanım arızası, tanımlanmamış veya farkına varılmamış kalite kontrol arızası (otomatik pipet kalibrasyonunun bozulmuş olması, v.b.)</p>	Günlük donanım, ısı vb. mikrobiyoloji laboratuvarlarında kritik öneme sahip noktaların anlatıldığı prosedür ve talimatlara her aşamada uyulması, kritik noktaların ilgili formlara gereken zaman dilimlerinde kayıt altına alınması.	Donanım Kullanma Prosedürü ve Donanım Kullanma Talimatlarına uyum ilgili donanımın kayıtlarının tutulduğu ilgili (kalibrasyon-bakım-onarım) formu ile Donanım Arıza Formunun düzenli olarak kullanılması, analiz sonuç raporuna analizin yapılamama nedeni hakkında açıklama yapılması / Her adımda donanımların kontrollerinin izlenmesi ile deney sonuçlarının doğruluğunun güvence altına alınması ve müşteri taleplerinin zamanında yerine getirilmesi sonucunda müşteri memnuniyetinin korunması ve artırılması.
9 ^a	<p>Risk: Gerekli durumlarda geri dönüş yapılamayan ve tekrarlanamayan analizler, talep edilen analiz sonuçlarının verilememesi ya da gecikmeli analiz sonuçlarının verilmesi.</p> <p>Sebep: Analiz sonuçlarının kayıt altına alınmaması/ kayba uğraması</p>	Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kritik öneme sahip noktaların anlatıldığı prosedür ve talimatlara her aşamada uyulması, kritik noktaların ilgili formlara ve analiz kayıt defterlerine gereken zaman dilimlerinde kayıt altına alınması, cihaz çıktılarının zamanında alınması ve yedeklemelerin kritik noktalarda yapılması.	Deney Sonuçlarının Kalitesi Prosedürü ve Kalite Kayıtlarının Kontrolü Talimatının etkin bir şekilde uygulanması. / Her adımda yapılan kayıtlar ile güvenilir ve geriye dönük izlenebilir sonuçların elde edilmesi, deney sonuçlarının doğruluğunun güvence altına alınması sonucunda müşteri taleplerinin zamanında yerine getirilerek müşteri memnuniyetinin korunması ve artırılması.

Sıra	Tespit Edilen Risk ve Sebep	Mevcut Kontroller	Açıklamalar (İzleme Raporlama) / Fırsatlar
10 ^a	Risk: Yanlış analiz sonucu, tespit edilen mikroorganizma sayıları için yanlış uygun/uygunsuzluk değerlendirmeleri sonucunda üretici aleyhinde işlemlerin gerçekleşmesine neden olunması Sebep: Kritik analiz sonuçlarının yorumlanmasında ilgili yönetmelik ve/veya dokümanların yanlış değerlendirilmesi personelin analiz aşamasında yaptığı hatalar, yetkin olmayan personelin analizlerde görevlendirilmesi.	İlgili teknik personelin yetkin ve yeterli olmasının yanında ilgili yönetmelik, prosedür, talimatlara uyarak, gerekli işlemlerin yapılmasını sağlaması. Tüm bunların kontrollü olarak gerçekleştirilmesi.	Deney Sonuçlarının Kalitesinin Prosedürü, Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü ve Talimatı, Uygun Olmayan Deney İşinin Kontrolü Prosedürü, Düzeltici Faaliyet Prosedürü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı İç Kalite Kontrol Talimatı, Mikrobiyoloji Birimi Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Talimatına Uyum Sağlanması, Düzeltici Faaliyet ve Uygun Olmayan Deney Bildirim Formunun etkin bir şekilde işletilmesi. / Personellerin yetkinliğinin her aşamada izlenmesi ile bireysel performanslarında artış sağlanarak laboratuvar performansının (analiz sayılarının, analiz çeşitliliğinin ve araştırma faaliyetlerinin) artırılması, doğru ve hızlı bir şekilde analizlerin sonuçlandırılarak müşteri memnuniyetinin artırılması.
11 ^b	Risk: Raporlamada gecikmeler yaşanması Sebep: Mikrobiyoloji Birimi ile Numune Kabul ve Raporlama Birimindeki iletişimin yeterli olmaması veya çeşitli nedenlerle aksaması (elektrik kesintisi, kullanılan sistemdeki bozukluklar, v.b)	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, ilgili formların tutulması. Gerekli oldukça sistemde güncellemeler yapılması, veri tabanlarının iyileştirilmesi, alternatif enerji kaynakları ile destek sağlanması.	Numuneye Uygulanan İşlemler Prosedürü Düzeltici Faaliyet ve Uygun Olmayan Deney Bildirim Formu / Daha hızlı ve kontrollü sonuçlar ile müşteri memnuniyetinin artırılması.
12 ^a	Risk: Analiz raporlarına ve detay formlarına (müşteriye ait üst yazı ve dilekçe, numune kabul formu v.b.), revizyon, analiz değerlendirmesi, ölçüm belirsizliğinin kullanımı, çeşitli tekrar veya revizyon çalışmalarına ulaşamaması, yetkinlik değerlendirmelerinin yeterince ya da hiç yapılamaması, analiz sonuçlarının (analiz raporlarının) müşteriye gönderilmesi. Sebep: Veri yedeklemelerinin (cihaz, analiz sonucu, yetkinlik, v.b.) yapılmaması veya eksik uygulanması	Mikrobiyoloji laboratuvarlarının en önemli noktalarını içeren ilgili prosedür ve talimatlara muhakkak uyulması, gerekli kayıtların gerekli zamanlarda tutulması, kritik noktalarda kritik önem arz eden analist/analistlere başvurularak beyin fırtınasının gerçekleştirilmesi, yetkin/yeterli olmayan analistin analizlere katılmaması ve karar sürecinde bulunmaması.	Kalite Kayıtlarının Kontrolü Talimatı, Uygun Olmayan Deney İşinin Kontrolü Prosedürü, Düzeltici Faaliyet Prosedürü Düzeltici Faaliyet ve Uygun Olmayan Deney Bildirim Formlarının, personel yetkinliğinin, veri yedeklemelerinin etkin bir şekilde izlenmesi. / Kalite yönetim sistemi gerekliliklerinin ve dokümanlarının etkin bir şekilde izlenmesi ile laboratuvar süreçlerinin doğru yönetilmesi sonucunda laboratuvar performansının (analiz sayılarının, analiz çeşitliliğinin ve araştırma faaliyetlerinin) artırılması.
13 ^a	Risk: Başlayan hataların sistematik ve düzenli olarak tekrar etmesi, sebep/sebeplerin ortadan kaldırılamaması, analiz sonuçlarının kalite ve güvencesinin tehdit altında olması. Sebep: Doğru olmayan ya da eksik düzeltici faaliyetler.	İlgili prosedür ve talimatlara uyularak, ilgili formların tutulması. Sürekli kontrollü takiplerin yapılması.	Deney Sonuçlarının Kalitesinin Prosedürü, Deney Metotlarının Geçerli Kılınması Prosedürü ve Talimatı, Uygun Olmayan Deney İşinin Kontrolü Prosedürü, Düzeltici Faaliyet Prosedürünün etkin bir şekilde izlenmesi, Düzeltici Faaliyet ve Uygun Olmayan Deney Bildirim Formunun katılımcı yöntemlerle doğru bir şekilde yapılarak işlenmesi / Kalite yönetim sistemi gerekliliklerinin ve dokümanlarının etkin bir şekilde izlenmesi ile laboratuvar süreçlerinin doğru yönetilmesi sonucunda laboratuvar performansının (analiz sayılarının, analiz çeşitliliğinin ve araştırma faaliyetlerinin) artırılması.

Not: a. Eski etki, olasılık ve risk puanı sırasıyla 5, 2 ve 10'dur. Riskin önem düzeyi "orta düzey" olarak belirlenmiştir. Düzeltmelerden sonra yeni etki, olasılık ve risk puanı sırasıyla 5, 1 ve 5 bulunmuştur. Riskin önem düzeyi "düşük düzey" olarak belirlenmiştir. **b.** Eski etki, olasılık ve risk puanı sırasıyla 4, 2 ve 8'dur. Riskin önem düzeyi "orta düzey" olarak belirlenmiştir. Düzeltmelerden sonra yeni etki, olasılık ve risk puanı sırasıyla 4, 1 ve 4 bulunmuş ve riskin önem düzeyi "düşük düzey" olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. Müdahalenin risk puanlarına olan etkisi.

Puanlama zamanı	Ortalama risk puanı	Standart sapma	Standart ortalama hata	t	p değeri
Çalışma Öncesi	9,84	0,55	0,15	64	p < 0,05
Çalışma Sonrası	4,92	0,27	0,27		

Risk puanlamaları karşılaştırıldığı zaman istatistik açıdan fark olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). Çalışma öncesi ortalama risk puanı ile standart sapma değerinin $9,84 \pm 0,55$ puan olduğu tespit

edilmiş, çalışma sonrası ise bu değerler $4,92 \pm 0,27$ puan olarak hesaplanmış, bu anlamda risk puanlarının azaldığı anlaşılmıştır. 4 ile 10 puan arasında dağılım gösteren risk puanlarının yapılan iyileştirmeler

ve risk analizinden sonra 5 civarında toplandığı, 17. ve 23. risklerin ise 4 puana düşerek iyileştiği görülmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada örnek bir risk analizinin hangi noktalara dikkat edilerek yapıldığı belirtilerek anlatılmaya çalışılmıştır. Araştırma sonucunda, risk tanımlamaları yapılmamış ve dolayısı ile hiçbir şekilde etkisi ile şiddeti bilinmeyen önceki sistem ile olası tüm risk tanımlamaları yapılmış ve etkisi ile şiddeti hesaplanarak skor elde edilen sistem arasındaki Risk Skoru sonuçları değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde, Aksay ve ark. (2011) tarafından bir kamu hastanesinde laboratuvar sürecine ilişkin yapılan Hata Türleri ve Etkileri Analizinde (HTEA) kan tahlili çalışmaları ile ilgili yedi adet potansiyel hata tespit edilmiştir. Laboratuvardaki cihazların kullanımı esnasında meydana gelebilecek potansiyel hatalar ana başlığından, ideal çevre şartlarının gerçekleştirilmemiş olması gibi (sıcaklık, nem, toz vb.) nedenlerle meydana gelen potansiyel hatalar olup, Risk öncelik sayısının (RÖS) 600 olduğu hesaplanmış ve en yüksek risk puanına sahip olduğu görülmüştür. Bu yüksek risk, klima, hava temizleyici, nemölçer, termometre kullanılmasının önerilmesi yoluyla çok büyük oranda düşürülmüştür (RÖS: 40). Ayrıca distile su kullanılmaması sonucu oluşabilecek RÖS puanı 500 olarak tespit edilmiş olup, distile su cihazı kalitesinin ölçümlenebileceği su analiz cihazlarının kullanılmasının sağlanması yoluyla risk puanının 100'e düşürülebileceği belirtilmiştir. Laboratuvar süreçlerine ait bu risk analizinde RÖS çarpım değerlerinin yüksek olmasının şiddet puanlarının yüksek hesaplanmasından kaynaklanmış olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada da yapılan müdahale etkisi açık olarak görülmüştür.

Risk analizi amacıyla tespit edilen riskler, FMEA yöntemi kullanılarak hızlıca analiz edilebilir. Riski ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için risk oluşmadan önce olası hataları belirleyen tanımlanmış sistematik işlem veri ve dokümanları kullanılması gerektiği daha önce belirtilmiştir (Uslu 2016). Çalışmamızda da anılan yöntem kullanılarak risk analizi kolay ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir.

Alınan önlemlerin etkinliğinin değerlendirilmesinde, hataları azaltma çabalarının (düzeltici ve önleyici faaliyetler) başarısı izlenmelidir. Değerlendirme için belirlenen kalite göstergeleri (müşteri şikayet sayısı, kalibrasyon verileri, iç ve dış kalite kontroller vb.) kullanılabilir. ISO gerekliliklerine uygun süreçleri yürütmek için kurum genelinde uygun

ve etkin personel eğitimi sağlanmalıdır (Rin 2009; Vasilnakova 2018). Bu anlamda alanında yetkin veya akredite olmayan personel, laboratuvar içi iletişim ve genel iş birliğini içeren alanlar ile tüm sistemin genel test sürecinin iyileştirilmesine dahil olması gerekmektedir. Eğitimin etkinliği çalışmamızın da temelini oluşturmuştur.

Gıda ve yem numunelerinin çalışıldığı mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışanları yaptıkları işin gereği olarak birtakım potansiyel tehlikelere maruz kalmakla beraber aynı risklerden numunelerin de etkilenebileceği düşünülmelidir. Güvenli çalışmanın temel unsuru olan çalışma planları (biyolojik hijyen, patojenlerle çapraz bulaşma) oluşturulmalı ve uygulamada azami düzeyde planlara uyulmalıdır. Bunun için, risk kaynaklarına ilişkin kontrol mekanizmalarının ilgili ulusal ve/veya uluslararası güncel standartlar kullanılarak çeşitli prosedür, talimat ve formlarla düzenli olarak işletilmesi, belirli periyotlarla kontrollerinin alanlarında yetkin olan personel ya da personeller tarafından yapılması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Aksay K. (2003) "Hastanelerde Risk Yönetimi ve Bağlantılı Fonksiyonlar: İstanbul Memorial Hastanesi Örneği", Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü. Eskişehir.
2. Aksay K, Orhan F, Kurutkan M. (2012) Sağlık Hizmetlerinde Bir Risk Yönetimi Tekniği Olarak FMEA: Laboratuvar Sürecine Yönelik Bir Uygulama. *Sağlıkta Performans ve Kalite Dergisi*. 4, 121-142.
3. Bolayır M. (2013) Laboratuvar süreçlerinde hata kaynakları. HA Sönmez ed. *Hastalıkların İzlenmesinde Biyokimya Laboratuvarı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:81, 17-24.
4. ECRI (2003) Risk and Quality Management Strategies, Healthcare Risk Control. Volume 2, March.
5. EUROLAB (2017) Cook Book: Doc No. 18 Risk Based Approach, p.5.
6. Griffin D. (2011) Hospitals. What They Are and How They Work, Third Edition, Jones and Bartlett Publishers, Inc, p.423.
7. ISO (2015) ISO/TS 17728: 2015 Gıda zinciri mikrobiyolojisi-Gıda ve hayvan yemlerinin mikrobiyolojik analizlerde numune alma teknikleri.p.12
8. ISO (2017) ISO 17025:2017 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.
9. ISO (2018) ISO 31000:2018 Risk Management-Guidelines. 2018 (3).p.6
10. Lee KM, Choi YJ, Park KH, Jang WJ. (2014) The Management of Laboratory Biological Safety in Korea. *J Bacteriology and Virology*. 44 (4), 342-351.
11. Mc Dermott RE, Mikulak RJ, Beauregard MR. (2009) The Basics of FMEA, CRC Press, New York.
12. Neogi SS, Mehndiratta M, Gupta S, Puri D. (2016) Pre-analytical phase in clinical chemistry laboratory. *J Clin Sci Res*. 5(3), 171-178.

13. Özata M, Altuncan H. (2010) Hastanelerde tıbbi hata görülme sıklıkları, tıbbi hata türleri ve tıbbi hata nedenlerinin belirlenmesi: Konya Örneği. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 8 (2),100-111.
14. Pillay A, Wang J. (2003) Modified failure mode and effects analysis using approximate reasoning. *Reliability Engineering and System Safety*. 79, 69–85.
15. Reid RD. (2005) "FMEA—Something Old, Something New", Quality Progress, May, 2005. (<http://asq.org/quality-progress/2005/05/standards-outlook/fmea-something-old-something-new.html>) Erişim Tarihi: 08.05.2020
16. Rejda EG. (2010) *Principles of Risk Management and Insurance*, Tenth Edition. Boston: Addison Wesley, p.748.
17. Rin DG, (2009) Pre-analytical workstations: A tool for reducing laboratory errors. *Clinica Chimica Acta*. 404(1), 68-74.
18. TS EN ISO 31010:2017 Risk Yönetimi- Risk değerlendirme teknikleri. p.70
19. Türk M. (2012) Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı. Bir Üniversite Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Risk Değerlendirmesi. *Türk Tabipleri Birliği Mesleki Sağlık ve Güvenlik Dergisi*, 27-43.
20. Uslu MK. (2016) Laboratuvar Çalışanlarının Karşılaştığı Fiziksel Risklerin Hata Türü ve Etkileri Analizi (HTEA) ile Değerlendirilmesi. Bir Üniversite Hastanesi Örneği. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sağlık Yönetimi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
21. Vasilnakova A. (2018). Risk Management in Accredited Testing Laboratories. Katalinic B. ed *Proceedings of the 29th DAAAM International Symposium*. DAAAM International, Vienna. pp.1071-1075.



Balıklardan izole edilen bakteriyel etkenler: Beş yıllık değerlendirme

Zeynep řık¹, Özlem Altıntaş², Enes Gazi Atıcı³

^{1,2,3} Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Su Ürünleri Hastalıkları Teşhis ve Araştırma Lab., Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 23.03.2020 Kabul Tarihi / Accepted: 18.05.2020

Özet: Bu çalışmada, 2015-2019 yılları arasında Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Su Ürünleri Hastalıkları Araştırma ve Teşhis Laboratuvarı'na gönderilen balık örneklerinden izole edilen bakteriyel etkenlerin dağılımı ve bu etkenlerin de bölgesel ve aylara göre dağılımı incelenmiştir. Bu süreçte laboratuvara gönderilen balık örneklerinden etken izolasyonu ve identifikasyonu, aseptik şartlarda konvansiyonel yöntemler ve hızlı teşhis kitleri (Vitek 2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 60 adet balık örneği incelenmiş ve bunların 27'sinde bakteriyel etken izole edilmiştir. İzole edilen etkenlerin dağılımının; *Aeromonas sobria* (%23,3), *Aeromonas hydrophila* (%6,7), *Shewanella putrefaciens* (%5), *Aeromonas veroni* (%3,3), *Serratia rubidaea* (%1,7), *Kocuria rhizophila* (%1,7), *Streptococcus iniae* (%1,7), *Pseudomonas aeruginosa* (%1,7) ve *Proteus* spp. (%1,7) oranında olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar göre; 2015-2019 yılları arasında balıklardan en fazla izole edilen etkenin *A. sobria* olduğu görölmüştür. Yine balıklardan izole edilen bakteriyel etkenlerin bölgesel ve aylara göre dağılımı incelendiğinde; bu etkenlerin en yaygın Haziran, Ağustos, Eylül, Ekim aylarında ve Ankara, Bolu, Kastamonu illerinde göröldüğü belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel Enfeksiyonlar, Balık, Vitek 2

Bacterial agents isolated from fish: A five year evaluation

Abstract: In this study, the distribution of bacterial factors isolated from the fish samples sent to the Veterinary Control Central Research Institute Fisheries Diseases Research and Diagnosis Laboratory between 2015-2019 and the distribution of these factors by regional and months were examined. In this process, the isolation and identification of the causative agent from fish samples sent to the laboratory was carried out using conventional methods and rapid diagnostic kits (Vitek 2). In the study, 60 fish samples were examined and bacterial agents were isolated in 27 of them. The distribution of the isolated bacteria; *Aeromonas sobria* (%23,3), *Aeromonas hydrophila* (%6,7), *Shewanella putrefaciens* (%5), *Aeromonas veroni* (%3,3), *Serratia rubidaea* (%1,7), *Kocuria rhizophila* (%1,7), *Streptococcus iniae* (%1,7), *Pseudomonas aeruginosa* (%1,7) and *Proteus* spp. (%1,7) was determined. According to the results obtained; *A. sobria* was observed to be the most isolated factor from fish between 2015-2019. When the distribution of bacterial species isolated from fish by regions and months is examined; It is determined that these bacteria are most common in June, August, September, October and in Ankara, Bolu, Kastamonu provinces.

Key words: Bacterial infections, Fish, Vitek 2

Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliği yoluyla gıda üretimi dünya genelinde oldukça hızlı bir gelişme göstermiştir. Bu gelişmelere paralel olarak kültür balıkçılığında çok sayıda balığın bir arada ve yakın temas halinde bulunması, doğada (dere, göl, gölet, deniz, vs) serbest yaşayanlara oranla, daha fazla hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Balıkların içinde yaşadıkları ortamın (tuzlu, acı, tatlı su) sınırlı olan besleyici, fiziksel, kimyasal, biyotik ve abiyotik optimal yaşam koşullarının olumsuz yönde değişmesi bunların kısa süre içinde düzelmemesi ve devam etmesi (Arda ve ark. 2005) sektörde ciddi kayıplarla sonuçlanan; viral, paraziter, fungal ve özellikle birçok bakteriyel hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde balıklarda hastalık etkenlerinin teşhisi ve dağılımıyla ilgili çalışmalar, hastalık

kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Çünkü bazı patojen mikroorganizmalar halk sağlığı açısından önemlidir (Wanja ve ark. 2019).

Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de üretimi yapılan işletmelerde oldukça sık rastlanan başlıca patojen bakteriyel etkenler arasında en çok izole edilen *Aeromonas* genusuna ait türlerdir. *Aeromonas* genusu, *Aeromonadaceae* familyası altında yer alan Gram negatif, fakültatif anaerob, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, nitratı nitrite dönüştürürler, O/F glukoz testinde fermantatif reaksiyon veren ve Vibriostat (O/129) testine dirençli, sporsuz omak şeklinde bakterilerdir. Doğal yaşam alanları deniz ve tatlı sularlardır. Sularda yaygın varlığı nedeniyle, etkenler tatlı su ve deniz balıklarının, kabuklu hayvanların ve amfibianların bağırsak florasında ve vücut yüzeylerinde bulunurlar. Bazı türleri insan, balık ve diğer akuatik

Yazışma adresi / Correspondence: Zeynep şık, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Su Ürünleri Hastalıkları Teşhis ve Araştırma Laboratuvarı Etlık-Ankara E-posta: zeynep.s@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-9010-7586 • ²0000-0001-6467-9647 • ³0000-0001-8311-2523

hayvanlarda enfeksiyonlara neden olur (Akaylı ve ark. 2011; John 2014; Fernandez-Bravo ve Figueras 2020). Önemli balık patojenleri olan *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* gibi hareketli *Aeromonas* türleri hemorajik septisemi (Hareketli *Aeromonas* Septisemisi, MAS) ile seyreden enfeksiyonlara neden olur. Enfeksiyonun inkübasyon süresi 2-4 gündür. Enfekte balıkların baş, yüzgeç, karın bölgelerinde hemorajik alanlar görülür. İç organlarda septisemiye bağlı hemorajik bir tablo dikkat çeker. Mortalite yüksektir. Hareketsiz *Aeromonas* türü olan *A. salmonicida* ise çeşitli balık türlerinde furunkulosis enfeksiyonuna neden olur. Akut olaylarda lezyon görülmeden ölüm şekillenir. Kronik enfeksiyonlarda yüzgeç ve kuyruk diplerinde furunküller oluşur. İç organlarda septisemi görülür (Toranzo ve ark. 1989; Esteve ve ark. 1993; Wahli ve ark. 2005; Aydın ve Paracıoğlu 2006; Austin ve Austin 2007; Wanja ve ark. 2019). Bu bakteriyel etkenler yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlarda primer etken olarak sorumlu olsa da konağın normal florasında bulunan bazı mikroorganizmalar konağın immun sistemi baskılandığında sekonder enfeksiyon olarak ortaya çıkabilir (John 2014). Bu enfeksiyonlar su ürünleri yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

2015-2019 yılları arasında Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (VKMAE) Su Ürünleri Hastalıkları Araştırma ve Teşhis Laboratuvarı'na, Ankara, Kayseri, Bolu, Çankırı, Çorum, Bartın, Kastamonu, Karabük, Yozgat, Nevşehir, Kırıkkale, Ordu, Eskişehir, Sivas, Zonguldak illerinden gönderilen örnekler incelenmiştir. Bu çalışmanın amacı, 2015-2019 yıllarında bakteriyel etkenlerin araştırılması amacıyla gönderilen balık örneklerinden elde edilen sonuçları retrospektif olarak değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya 2015-2019 tarihleri arasında VKMAE Su Ürünleri Hastalıkları Teşhis ve Araştırma Laboratuvarı'na hastalık teşhisi amacıyla gönderilen

yabani, çiftlik ve akvaryum balık örneklerinden izole edilen bakteriler dahil edilmiştir. Araştırmada 60 adet balık örneği kullanılmıştır. Balık örneklerinin abdominal bölgesinin derisi %70'lik etil alkol ile temizlendikten sonra dorsoventral olarak diseksiyonu yapıldı ve balıkların iç organlarından (karaciğer, dalak, beyin ve böbrek) %5 koyun kanlı agar (Oxoid, İngiltere), MacConkey agar (Oxoid, İngiltere), Nutrient agar (Oxoid, İngiltere) besiyerine bakteriyolojik ekimler yapılmıştır. Yapılan bakteriyolojik ekimler 24-48 saat 21°C'de inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda üremeler değerlendirilmiştir. Bu amaçla; Gram boyama yapılarak mikroskopik morfolojileri incelenmiştir. Bakteriyel izolatların tanımlanmasında biyokimyasal testleri Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) hızlı tanı kitleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmada 60 balık örneği incelenmiş ve 27'sinde bakteriyel etken izole edilirken, 33 örnekte izolasyon gerçekleşmemiştir. Bakteriyel etkenlerin balık türlerine göre dağılımı ise; 13 alabalıktan (5 *A. sobria*, 2 *A. hydrophila*, *A. veroni*, *S. rubidaea*, *Proteus* spp., 2 *S. putrefaciens*, *P. aureginosa*), 1 gümüş balığından (*A. sobria*), 1 mersin balığından (*A. sobria*), 1 pullu sazandan (*A. sobria*), 10 sazandan (6 *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. veroni*, *S. putrefaciens*, *K. rhizophila*), 1 zebra balığından (*A. hydrophila* ve *S. iniae*) izole edilmiştir. Bakterilerin çoğunluğu Gram negatif (%92,9) iken Gram pozitif bakterilerin oranı daha düşüktür (%7,1). Örneklerden en sık izole edilen etkenler *A. sobria* (%23,3), *A. hydrophila* (%6,7), *S. putrefaciens* (%5), *A. veroni* (%3,3)'dir. Diğer bakteriyel etkenler *S. rubidaea* (1,7), *K. Rhizophila* (1,7), *S. iniae* (1,7), *P. aureginosa* (1,7) ve *Proteus* spp. (1,7) izole edilmiştir (Tablo 1). Çalışmamızda en sık pozitif olgu sayısı Haziran, Ağustos, Eylül ve Ekim gibi su sıcaklığının yüksek olduğu aylarda saptanmıştır (Tablo 3). İllere göre pozitif olgu sayısının yoğunluğu ise Ankara, Bolu ve Kastamonu'da gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 1: Balıklardan izole edilen bakteriyel etkenlerin dağılımı

Bakteriler	Toplam sayı	Bakteri saptanan örnekler içindeki oran	Tüm örnekler içindeki oran
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	14,3	6,7
<i>Aeromonas veronii</i>	2	7,0	3,3
<i>Aeromonas sobria</i>	14	50,0	23,3
<i>Serratia rubidaea</i>	1	3,6	1,7
<i>Shewanella putrefaciens</i>	3	10,7	5,0
<i>Proteus</i> spp.	1	3,6	1,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	3,6	1,7
<i>Kocuria rhizophila</i>	1	3,6	1,7
<i>Streptococcus iniae</i>	1	3,6	1,7

Tablo 2: Örneklerin mevsimlere göre dağılımı (2015-2019)

Mevsim	Örnek sayısı	Pozitif Olgu	Negatif Olgu
Kış	5	4	1
İlkbahar	8	3	5
Yaz	31	9	22
Sonbahar	16	11	5
Toplam	60	27	33

Tablo 3: Balıklardan izole edilen bakteriyel etkenlerin aylara göre dağılımı (2015-2019)

Aylar	Etkenler								
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>S. rubidaea</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>S. putrefaciens</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>S. iniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ocak	1	-	1	-	-	1	-	-	-
Şubat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mart	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nisan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mayıs	1	-	1	-	-	-	-	-	1
Haziran	-	1	2	-	-	1	-	-	-
Temmuz	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Ağustos	-	1	2	-	1	-	-	-	-
Eylül	-	-	4	1	-	-	1	-	-
Ekim	1	-	2	-	-	-	-	1	-
Kasım	-	-	1	-	-	1	-	-	-
Aralık	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4: İllere göre pozitif olgulardan izole edilen bakterilerin dağılımı (2015-2019)

İl	Etkenler								
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>S. rubidaea</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>S. putrefaciens</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>S. iniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ankara	2	-	2	-	-	-	-	1	-
Çankırı	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Kayseri	-	1	3	-	-	-	-	-	-
Nevşehir	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Yozgat	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Çorum	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Bolu	-	1	3	-	-	-	-	-	1
Bartın	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Kastamonu	1	-	1	-	1	2	-	-	-
Karabük	-	-	2	1	-	-	-	-	-
Toplam	4	2	14	1	1	3	1	1	1

Sonuç ve Tartışma

Su ürünleri yetiştiriciliğini etkileyen önemli hastalıklar bakteri, mantar, virüs ve paraziter etkenlerden kaynaklanmaktadır. Birçok patojen arasında, bakteriler en önemli etiyolojik ajan grubunu oluşturur. Türkiye'de 48 patojenik bakteri raporlanmıştır. Rapor edilen hastalıklar arasında en yaygın görülen balık hastalıkları etkenleri *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*,

Yersinia spp., *Photobacterium spp.* ve *Flavobacterium spp.* olduğu bildirilmiştir (Öztürk ve Altınok 2014). Bu çalışmada hasta balık örneklerinden *A. sobria* (%23,3), *A. hydrophila* (%6,7), *S. putrefaciens* (%5), *A. veroni* (%3,3) ve diğer bakteriyel etkenler *S. rubidaea*, *K. rhizophila*, *S. iniae*, *P. aeruginosa* ve *Proteus spp.* izole edilmiştir. Bazı araştırmacıların (Erdem ve ark. 2010; Özkök 2005) aksine bu çalışmada örneklerden

en sık izole edilen etken *A. sobria* (%23,3) olmuştur. Bu sonuç *A. sobria*'nın hasta balıklarda yaygın olarak görüldüğünü bildiren araştırmacıları desteklemektedir (John 2014; Onuk ve ark. 2015). *A. sobria*'nın hasta balıklarda yüksek oranda izole edilmesi, sulardaki yaygın varlığı (Onuk ve ark. 2013; John 2014) nedeniyle etken tatlı su ve deniz balıklarının bağırsak florasında ve vücut yüzeylerinde bulunmasıyla ilişkilendirilebilir. Normalde hastalık oluşturmeyen etken konağın immün sisteminin zayıflaması veya çevre şartlarının değişmesine bağlı olarak hastalık oluşturmuş olabilir.

Bakteriyel enfeksiyonlarının teşhisinde, bakterinin cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için klasik mikrobiyolojik tanı yöntemleri ile 16S rDNA dizi analizine dayanan moleküller yöntemleri altın standart olarak kabul edilmekte ve önemini korumaktadır (Laupland ve Valiquette 2013). Klasik mikrobiyolojik tanı yöntemleri güvenilirdir ancak hızlı ve pratik olmayabilir. DNA dizi analiz yöntemleri bütün mikroorganizmaların tanımlanmasında altın standart olduğu tartışmasız olmakla birlikte, bu yöntemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında günlük kullanımı olası değildir (Erdem ve ark. 2017). Üstelik bazı teknik kısıtlamaları ve yüksek maliyeti de bulunmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarından, rutin örneklerin en hızlı şekilde işlenmesi ve en doğru sonucun iletilmesi beklenmektedir. Bu sebepler günümüzde hastalık etkenlerinin cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için araştırmacıları API ve VITEK (Carriero ve ark. 2016; Laith ve ark. 2017; Rosso ve ark. 2019) gibi hızlı teşhis kitlerinin kullanımına yöneltmiştir. Hızlı teşhis kitleri *Aeromonas* türlerinin fenotipik yakınlığı nedeniyle tür düzeyinde identifikasyonunda çok güvenilir sonuç vermese de benzer özellik gösteren türlerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Beaz-Hidalgo ve ark. 2010; Duman 2017; Fernandez-Bravo ve Figueras 2020). Bu çalışmada balık örneklerinden etken izolasyonu ve identifikasyonu, konvansiyonel yöntemler ve hızlı teşhis kitleri (Vitek 2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 60 hasta balık örneğinin 27'sinde bakteriyel etken izole edilirken 33'ünde izolasyon gerçekleşmemiştir. Negatif olgu sayılarının dağılımı sırasıyla en fazla yaz (%36,7), ilkbahar (%8,3) ve sonbahar (%8,3) aylarında (Tablo 2) olduğu tespit edilmiştir, bu önemli bir bulgudur. Çünkü bazı araştırmacılar (Crear ve ark. 2020; Feidantsis ve ark. 2020) su sıcaklık değişiminin balıklarda metabolik hastalıklar oluşturmada sonucunda ölümlere neden olduğunu bildirmiştir. Balık hastalıklarının teşhisinde sıcaklık değişiminin balıklar üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla balıkların fizyolojik ve çevresel to-

leranslarının ölçülmesi çalışmalarına da gereksinim vardır. Çünkü çevre ısısı primer bir hastalık nedeni de olabilir. Biz sadece balıklarda hastalık oluşturan bakteriyel etkenler üzerine genel bir değerlendirme sunmaya çalıştık. Kültürlerden negatif sonuçların elde edilmesi hasta balıklara önceden antibakteriyel bir ilaç tedavisi uygulanmış olabileceğiyle ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda 2015-2019 yılları arasında farklı su sıcaklıkları ve akarsu tiplerinden (baraj, dere, göl, gölet, deniz, vs) gönderilen hasta balıklarda gözlenen en sık pozitif olgu sayısı Haziran (4), Ağustos (4), Eylül (6) ve Ekim (4) aylarında görülmüştür. Bu aylarda en yüksek oranda *A. sobria*, *A. hydrophila* ve *A. veroni* türleri tespit edilmiştir. *Aeromonas* türlerine kış aylarında da rastlanmıştır. *S. putrefaciens* hem kış aylarında hem de yaz aylarında izole edilmiştir. Deniz ve tatlı sularda yaygın olarak bulunan *S. putrefaciens*; balıklarda çoğunlukla deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile birlikte ülserlere ve nekrotik lezyonlara neden olur. Salgınlar esas olarak ilkbahar mevsiminde su sıcaklığının 7 ile 10°C olduğu zamanlarda, *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp. enfeksiyonlarıyla birlikte seyreder. *Shewanella* türleri, hasta ve sağlıklı balıklardan ve sulardan izole edilebilirler (Jung-Schroers ve ark. 2017). Çalışmamızda sporadik olarak rastlanan; *S. rubidaea*, *K. rhizophila*, *P. aureginosa*, *Proteus* spp. türleri yaz aylarında izole edilmiştir. Sıcak su (15 °C üzeri) Streptokokkosis'i olarak bilinen *S. iniae*, Ekim ayının başında *A. hydrophila* ile birlikte izole edilmiştir. Sonuç olarak su sıcaklığının yüksek olduğu aylarda yaygın olarak hareketli *Aeromonas* türleri izole edilmiştir. Çalışmamızda hasta balıklardan izole edilen bakteriyel etkenlerin dağılımında, örnekleme zamanı ile yaygın türler arasında yakın bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Bazı araştırmacılar (Cavari ve ark. 1981; Lee ve ark. 2002) su sıcaklığının yüksek olduğu aylarda patojen *Aeromonas* türlerinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda su sıcaklığının enfeksiyonun oluşmasında önemli bir yeri olduğu söylenebilir.

Duman'ın (2017) yaptığı tez çalışmasında 103 adet hareketli *Aeromonas* türünün kökenlerinin bölgesel olarak dağılımı rapor etmiştir. Bu rapor sonucunda hareketli *Aeromonas* türleri en sık İç Anadolu bölgesinde gözlendiğini bildirmiştir (Duman 2017). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre hasta balıklardan izole edilen etkenlerin illere göre dağılımı yapılmış ve İç Anadolu bölgesinde yer alan illerden yukarıda bildirilen araştırmacıyla benzer sonuçlar elde edilirken Batı Karadeniz bölgesinde yer alan illerde de en yüksek *A. sobria* izole edilmiştir. En fazla

pozitif olgu sayısı Batı Karadeniz bölgesinde (%51,8) gözlenmiştir. Illere göre en yüksek pozitif olgu sayısı Ankara, Bolu ve Kastamonu da tespit edilmiştir. *P. aureginosa* insan patojenidir. İnsana özgü olan bu patojenin bu araştırmada balıktan izole edilmesinin tespiti çok değerli bir bilgidir.

Çalışmamızda tespit edilen farklılıkların sebebi; konağa bağlı faktörler, patojen mikroorganizmaların doğal yaşam alanının deniz ve tatlı sular olması, su kirliliği, stres, yetersiz beslenme, mevsime bağlı olarak değişen su sıcaklığı, coğrafi farklılıklar etkili olabilir. *Aeromonas* türlerinin su ve balıklarda yaygın olarak bulunması, mevsimsel ve bölgesel değişiklik göstermesi bilgilerine dayanarak bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar iyi değerlendirilmelidir. Sonuç olarak çalışmamızın bulguları, yurtdışı ve yurt içi çalışmaların birçoğu ile uyumlu olmakla birlikte sonuçların bölgesel olarak da değişebileceğini söyleyebiliriz.

Teşekkür: Bu çalışmanın her aşamasında emeği olan ve makalenin hazırlanmasında desteğini esirgemeyen laboratuvar şefimiz sayın Uzm. Veteriner Hekim Selahattin ŞEN'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- 1- Akaylı T, Çanak Ö, Başaran B. (2011) Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) görülen *Aeromonas schubertii* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4, 99-106.
- 2- Arda M, Seçer S, Saheyüpoğlu M. (2005) *Balık Hastalıkları*. Medisan Yayınları. Ankara.
- 3- Austin B, Austin DA. (2007) *Bacterial Fish Pathogens*. 4. Edt., UK, Praxis Publishing.
- 4- Aydın N, Paracıoğlu J. (2006). *Veteriner Mikrobiyoloji*. İlke-Emek Yayınları.
- 5- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Bujan N, Romalde JL, Figueras MJ. (2010) Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 149-153.
- 6- Carriero AA, Mendes Maia AA, Moro Sousa RL, Henrique-Silva F. (2016) Characterization of a new strain of *Aeromonas dhakensis* isolated from diseased pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in Brazil. *J Fish Dis.* 39, 1285-1295.
- 7- Cavari BZ, Allen DA, Colwell RR. (1981) Effect of temperature on growth and activity of *Aeromonas* spp. and mixed bacterial populations in the Anacostia River. *Applied and Environmental Microbiology*. 41,1052-1054.
- 8- Crear DP, Brill RW, Averilla LML, Meakem SC, Weng KC. (2020) In the face of climate change and exhaustive exercise: the physiological response of an important recreational fish species. *R Soc Open Sci* 25;7(3):200049.
- 9-Duman M. (2017). Gökkuşuğu alabalıklarında görülen motil *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* bakterilerinin antimikrobiyal duyarlılıkları ve duyarlılıkta rol oynayan genlerin tespiti. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- 10- Erdem B, Kariptaş E, Kaya T. (2010) Siderophore, hemolytic, protease, and pyrazinamidase activities and antibiotic resistance in motil *Aeromonas* isolated from fish. *Turk J Biol.* 34, 453-462.
- 11- Erdem H, Erganiş S, Evren E, Aksakal FN, Çağlar K, Kalkancı A. (2017) *Candida* cinsi mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırmalı analizi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 47, 114-124.
- 12- Esteve C, Biosca EG, Amaro C. (1993) Virulens of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels, *Anguilla Anguilla* reared in fresh water. *Dis. Aqua. Org.* 16, 15-20.
- 13- Feidantsis K, Georgoulis I, Zachariou A, Campaz B, Christoforou M, Pörtner HO, Michaelidis B. (2020) Energetic, antioxidant, inflammatory and cell death responses in the red muscle of thermally stressed *Sparus aurata*. *J Comp Physiol B.* doi: 10.1007/s00360-020-01278-1.
- 14- Fernandez-Bravo A, Figueras MJ. (2020) An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*. 8, 129.
- 15- John N. (2014) Distribution, extracellular virulence factors and antibiogram of motile aeromonads in fresh water ornamental fishes and immune response of *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila* infection. Thesis. Cochin University of Science and Technology.
- 16- Jung-Schroers V, Jung A, Ryll M, Bauer J, Teitge F, Steinhagen D. (2017) Methods for identification and differentiation of different *Shewanella* spp. isolates for diagnostic use. *J Fish Dis.* 41, 689-714.
- 17- Laith AA, Ambak MA, Hassan M, Sheriff SM, Nadirah M, Draman AS, Wahab W, Ibrahim WN, Aznan AS, Jabar A, Najiah M. (2017) Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet World.* 10, 101-111.
- 18- Laupland KB, Valiquette L. (2013) The changing culture of the microbiology laboratory. *J Infect Dis Med Microbiol.* 24, 125-8.
- 19- Lee C, Cho J-C, Lee S-H, Lee D-G, Kim S-J. (2002) Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *Journal of Applied Microbiology.* 93, 976-985.
- 20- Onuk EE, Fındık A, Turk N, Altun S, Korun J, Özer S, Avsever ML, Çiftçi A. (2013) Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions. *Revuc Med. Vet.* 164, 200-2006.
- 21- Onuk EE, Durmaz Y, Çiftçi A, Pekmezci GZ, Kılıçoğlu Y. (2015) Çeşitli Balık Türlerinden İzole Edilen Patojen Bakterilerin ve Antibiyotik Direnç Profilleri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 10, 156-164.
- 22- Özkök S. (2005) Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) görülen önemli bakteriyel etkenlerin tespiti ve antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi.* 16, 1-2.
- 23- Öztürk RÇ, Altınok İ. (2014) Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 14, 275-297.
- 24- Rosso F, Cedano JA, Parra-Lara LG, Sanz AM, Toala A, Velez JF, Hormaza MP, Moncada PA, Correa A. (2019) Emerging carbapenem-resistant *Aeromonas* spp. infections in Cali, Colombia. *Braz J Infect Dis.* 23, 336-342.
- 25- Toranzo AE, Baya AM, Romalde JL, Hetrick FM. (1989) Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesueur. *J. Fish Dis.* 12, 439-448.
- 26- Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. (2005) *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.* 28, 141-150.
- 27- Wanja DW, Mbuthia PG, Waruiru RM, Mwadime JM, Bebora LC, Nyaga PN, Ngowi HA. (2019) Bacterial pathogens isolated from farmed fish and source pond water in Kirinyaga County, Kenya. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies.* 7, 295-301.



Bingöl'de yetiştirilen sığır sürülerinde Bovine Viral Diyare Virüs enfeksiyonunun varlığının ve yaygınlığının belirlenmesi

Metin Gürçay¹, Hakan Keçeci², Merve Öztürk³

¹ Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Düzağaç, Bingöl, Türkiye
^{2,3} Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Düzağaç, Bingöl, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.12.2019, Kabul tarihi / Accepted: 05.05.2020

Özet: Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) enfeksiyonu, sığır yetiştiriciliğinde önemli bir yetiştirme hastalığıdır. Persiste infekte (PI) hayvanlar, hayvan sürüleri içinde ve sürüler arasında ana virüs taşıyıcısı ve temel virüs bulaştırıcısıdır. Bu nedenle, sığır sürülerinde PI hayvanların varlığı belirlenmeli ve sürülerden uzaklaştırılmalıdır. Bu çalışmada, Bingöl ilinden farklı periyotlarda farklı amaçlar için Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen toplam 105 sığırdan kan örnekleri alındı. Bu kan örneklerinde BVDV antijeni ve antikorlarının varlığı, enzim immünojenik test (ELISA) ile test edildi. Örneklenen 105 numunenin 12'sinde (% 11,42) BVDV antijeni ve 40'nda da (% 38,09) BVDV antikorlarının varlığı tespit edildi. PI hayvanlar, BVDV antikor taşımayan sadece antijen tespit edilenler olarak tanımlandı. Bingöl ilinde yetiştirilen sığır sürülerinde persiste BVDV varlığı, % 2,85 oranında belirlendi. Rasyonel sığır yetiştiriciliği açısından BVDV enfeksiyonunun kontrol edilmesinin gerekliliği bu çalışma ile bir kez daha vurgulanmıştır. Enfeksiyonun eradikasyonu, gelişmiş sürü sağlığına ek avantajlar sunar. Bununla birlikte sürülerin sıkı biyogüvenlik tedbirleriyle taranması da uygun bir sığır popülasyonu oluşturur.

Anahtar kelimeler: Antijen, Antikor, Bingöl, Sığır, Sığır İshal Virüsü

Determination of presence and prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus infection in cattle herds in Bingol province

Abstract: Bovine Viral Diarrhoea virus (BVDV) infection is an important cultivate disease in cattle breeding. Persistent infected (PI) animals are the main virus carrier with in and between herds at virus transmission. Therefore, the presence of persistent infected (PI) animals should be determined and removed from the cattle herds. In this study, it was aimed to determine the presence and prevalence of BVDV infection in cattle herds in Bingöl. A total of 105 blood samples collected from cattle herds in Bingöl were obtained by sampling from animals brought to Bingöl University Veterinary Faculty Clinics for different purposes. The presence of BVDV antigen and antibodies in these blood samples was investigated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test. The presence of BVDV antigens in 12 (11.42%) and antibodies in 40 (38.09%) were detected of the samples. On the otherhand in the tree cattle BVDV antibody was not detected but only the antigen was detected. Although the presence of antigens could be detected in the three cattle, antibody could not be detected, which was evaluated as the animals were persistent. In this study, the presence of persistent BVDV infection in cattle herds the region was demonstrated 2.85%. It has emphasized the need to control of the BVDV infections in the region for rational cattle breeding. Eradication offers the supplementary advantage of developed herd health; however, it also compose favorable cattle population that needs to be screened by strict biosecurity.

Key words: Antibody, Antigene, Bingol, Bovine Viral Diarrhoea Virus, Cattle

Giriş

Bovine Viral Diyare Virüs (BVDV) enfeksiyonu, sığırların Türkiye dahil dünya çapında ana patojenlerinden biridir. Virüs, *Flaviviridae* familyasındaki *Pestivirus* cinsinde yer alır. *Pestiviruslar* dört tür içerir. Bunlar; *Bovine Viral Diyare Virüs*, *Border Disease virüs* (BDV), *Classical Swine Fever virüs* (CSFV) ve ayrıca zürafadan izole edilen yeni bir türdür (Erol ve ark.2014). BVDV, BVDV1, ve BVDV2 diye iki geno-

tipe ayrılır. BVDV2'nin dört alt genotipi, BVDV1'in minimum 21 alt genotipi tanımlanmıştır (Alpay ve ark. 2019; Oğuzoğlu ve ark. 2019). BVDV'nin yaklaşık 12.5 kilobazlık tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA genomu vardır. Virüs sitopatojenik (CP) olan ve sitopatojenik olmayan (NCP) iki biyotipten oluşur. Genellikle sahada en fazla izole edilmiş olanı NCP'dir. Hücre ölümüne neden olmadan monoleyer hücre kültüründe çoğalır. Persistent ve ömür boyu

bir enfeksiyonu oluşturabilmek için gebe sığırlarda plasentayı geçebilir (Fray ve ark. 2000). PI buzağılar, uterus embriyonik gelişimin 45.gününden 125. gününe kadar gebe sığırlarda virüsün plasentayı geçmesi ve immün yetersiz fötüsün enfeksiyonu sonucunu oluşturur (Walz ve ark. 2010). Virüsün CP biyotipleri, NCP virüsünün mutasyonu ile ortaya çıkabilir (Donis 1995; Houe 1999).

BVDV, sığırlarda ishal, kısırlık, yavru atma, solunum yolu hastalıkları, düşük büyüme performansı, diğer enfeksiyonlara yakalanma sıklığının artması, gebe ineklerde fetüsün persiste enfeksiyonu ve ölümüne neden olabilir. BVDV'nin bulaşması çeşitli şekillerde olur. Çoğunlukla duyarlı hayvanların akut enfeksiyon geçiren veya persiste enfekte hayvanlarla direkt temas sonucu gerçekleşmektedir. Ayrıca enfekte bireylere ait gözyaşı-burun akıntıları, tükürük, semen, dışkı, idrar, ter ve süt gibi tüm salgılarla indirekt olarak temas ile de bulaşır. Ek olarak kontamine aşılarda, embriyo transferi, aşılama ve enjeksiyon gibi iatrojenik yollarla da bulaşma gerçekleşebilir. Persistent enfekte (PI) hayvanlar birincil enfeksiyon kaynağıdır, PI hayvanla doğrudan temas virüsün iletilmesinde önemlidir ve bu hayvanlar hayatları boyunca çok miktarda virüs saçarlar (Richter ve ark. 2017; Alpay ve ark. 2019). Bununla birlikte, PI hayvanlar BVDV'ye spesifik antikorlar geliştirmeyebilir. Bu hayvanlar sadece yaşamları boyunca virüsü saçmakla kalmaz, aynı zamanda persistent bir hayvan doğumuna da yol açar. PI hayvanları sürüden ayrılmadığında, klinik semptomlardan kaynaklanan ekonomik kayıplar yeterince kontrol edilemez (Richter ve ark. 2017; Alpay ve ark. 2019). İnek, gebeliğin ilk üç ayında sitopatogenik olmayan BVDV suşu ile enfekte olurken, fetüsün yeterli bir bağışıklık yanıtı yoktur. Bu nedenle fetüste persistent enfeksiyon gelişir ve virüs buzağı yaşadığı müddette vücudunda kalır. Persistent enfekte olmuş hayvanlar viremiktir (virüs-pozitif ve antikor-negatif veya seronegatif). Bu hayvanlar tüm vücut salgılarıyla sürekli olarak büyük miktarda virüs saçarlar; virüsün sürüde kalmasını sağlarlar. Sığır popülasyonlarında bir virüs rezervuarıdır (Zimmer ve ark. 2004). Sığır popülasyonlarında ortaya çıkan bozukluklar ve virüsün persistent karakteri sığır endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Enfeksiyon, sürdürülebilir sığır yetiştiriciliği için bir tehdit unsuru olarak kabul edilir (Gunn ve ark. 2005; Houe ve ark. 2006).

Bingöl ilinin fiziksel, coğrafi konumu tarımsal faaliyetleri büyük ölçüde belirler niteliktedir. Şehrin yaklaşık % 42'sini oluşturan geniş mera alanlarının varlığı (Kaynak: Bingöl İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, 2016) tarımsal faaliyet içerisinde hayvancılığın

birinci plana taşınmaktadır. Bingöl büyükbaş hayvan sayısı bakımından 125 bin civarında hayvan varlığı (Kaynak: Bingöl İl Tarım ve Orman Müdürlüğü,2016) ile sığır yetiştiriciliğinin yapıldığı önemli merkezlerden biridir (Esen 2017). BVDV dünya çapında seroprevalansının % 40-80 arasında, persistenliğinin % 0,5 ile 4 olduğu endemik bir hastalıktır (Vargas ve ark. 2009). Sürüde PI hayvanlarının belirlenmesi ve uzaklaştırılması kontrol ve eradikasyon programlarının temel özelliğini oluşturur. Bununla birlikte iyi bir sürü yönetimi ve aşılamaların düzenli ve zamanında yapılması da çok önemlidir (Duncan ve ark. 2016; Alpay ve ark. 2019).

Hastalıkla yapılacak mücadele stratejilerini ortaya koymak için PI hayvanların dağılım ve durumunu belirlemek gerekmektedir. Bu nedenle, çalışmanın amacı, BVDV'nin Bingöl'deki varlığını ve yaygınlığını belirlemek ve persistentliğinin oranını ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

Kan numuneleri Bingöl il merkezinde yetiştirilen sığırlardan rastgele örnekleme metodu ile yapılmıştır. Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine değişik amaçlarla getirilen 105 sığırdan sağlanan örnekler, Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan onay ve Bingöl İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nden alınan izinlere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 2018 yılında yapılan örnekleme çalışmaları 0-59 gün ile 60 gün-10 yaş aralığındaki hayvanlardan 2 grup halinde oluşturulmuştur (Tablo 1).

BVDV antijen tespitinde, tam kan örneği için EDTA'lı steril tüpler kullanılmıştır. İlk testte pozitif olan hayvanlar en az üç hafta sonra barınaklarda tekrar muayene edilmiş ve persistentlik durumunu belirlemek için yeniden kan alınmıştır. Tüm kan örnekleri test edilene kadar -20 ° C'de saklanmıştır.

BVDV antikor tespitinde de vakumlu steril kan toplama tüpleri kullanılmıştır. Her hayvanın vena jugularisinden kan örneği alındıktan sonra serum elde etmek için 3000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra serum numuneleri 56 ° C su banyosunda 30 dakika süreyle inaktive edilmiştir.

ELISA testi ile BVDV Antijeni tespiti

Tam kan örneklerinde lökosit düzeylerini belirlemek için 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. BVDV antijenleri yönünden tam kan numunelerdeki lökosit tabakası, IDEXX BVDV Ag / Serum Plus Test kiti ile (IDEXX, İsviçre) belirlenmiştir. Test protokolü üretici tarafından önerildiği gibi gerçekleştirilmiş ve test

sonuçları da ELISA okuyucusunda (Thermo-Multiskan EX, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

ELISA testi ile BVDV Antikoru tespiti

Kan serumu örneklerinde, BVDV antikor varlığının belirlenmesi için IDEXX BVDV p80 Ab Test kiti (IDEXX, İsviçre) kullanılmıştır. Test protokolü de üretici tarafından önerildiği şekliyle gerçekleştirilmiş ve test sonuçları da ELISA okuyucusunda (Thermo-Multiskan EX, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analiz

Bu çalışmada yaş grupları arasında istatistiksel analiz Chi-Square (X^2) testi (Minitab 16 istatistik yazılımı, ABD) ve korelasyon testi (Minitab 16 istatistik yazılımı, ABD) kullanılarak yapılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Bingöl'deki sığır işletmelerinden yaptığımız örneklemede 0-59 gün yaş aralığında bulunan birinci grupta 44 Simental bir tane de Brown Swiss ırkı hayvan yer almıştır. Bu grupta yapılan BVDV virüs testinde 4 örnekte antijen ve 15'inde de antikor bulunmuştur. 60 gün-10 yaş aralığındaki ikinci grupta bulunan toplam 60 hayvanın 57'si Simental, 2'si Brown Swiss ve 1'i de Melez sığır ırkından meydana gelmiştir. BVDV virüs test sonuçlarına göre, 8 'inde antijen ve 25'inde de antikor saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, Bingöl'de yetiştirilen 105 sığırın 12 'sinde (% 11.42) BVDV antijeni, 40 'ında (% 38.09) da BVDV antikoru tespit edilmiştir. 0-59 gün yaş gurubundaki 2 sığır ve 60 gün- 10 yaş gurubundaki 1 hayvanda antikor tespit edilemediği halde antijenin var olduğu tespit edilmiştir. Bu hayvanlar buldukları işletmeler iki ay takibe alındıktan sonra bu hayvanların testleri tekrarlanmıştır. Tekrar yapılan test sonuçlarına göre ilk belirlenen test sonuçlarını koruduğu görülmüştür. Tüm elde edilen sonuçlara göre toplam 105 hayvan içinde 3'ünün (%2.85) persiste olduğu görülmüştür.

Tablo 1: Örneklemeye yapılan hayvanların yaş grupları, cinsiyet, ırk sayıları ve antijen - antikor verileri.

	n	Hayvanların Yaşı	Dişi	Erkek	Simental	Brown Swiss	Melez	Antijen		Antikor	
								+	-	+	-
1. Grup	45	0-59 gün	11	34	44	1	0	4	41	15	30
2. Grup	60	60 gün – 10 yaş	39	21	57	2	1	8	52	25	35

Tablo 2: Antijen ve antikor verilerinin yaş gruplarına göre istatistiksel analizleri.

Antijen

Yaş	n	Antijen (+)	%	Antikor (-)	%	İstatistik
0-59 gün	45	4	8.9	41	91.1	$X^2 = 0.502$
≥ 60 gün	60	8	13.3	52	86.7	$P = 0.690$

Antikor

Yaş	n	Antijen (+)	%	Antikor (-)	%	İstatistik
0-59 gün	45	15	33.3	30	66.7	$X^2 = 0.757$
≥ 60 gün	60	25	41.7	35	58.3	$P = 0.505$

Tabloda görüldüğü gibi yaş grupları arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca yaş, seropozitiflik ve seronegatiflik arasındaki korelasyon testine göre seronegatiflik yaşla birlikte artmıştır (Tablo2).

Tartışma ve Sonuç

BVDV sığırlarda abort, ölü doğum, fetal rezorpsiyon, konjenital malformasyonlar, fetal enfeksiyon, büyüme geriliği, gebelik oranında azalma, konjenital defekt, gelişmemiş buzağı doğumu ve pnömo-enterite

neden olmaktadır. Özellikle immunosupresyona yol açması sebebiyle diğer hastalıklar için de hazırlayıcı faktör konumundadır (Walz ve ark. 2010). BVDV, sığırlarda hayvan sağlığına en fazla etkisi olan 10 enfeksiyondan biridir (Edgar 2004). Dünyanın birçok ülkesinde yapılan serolojik ve virolojik çalışmalar hastalığın yüksek oranda sığır popülasyonunda hastalığa neden olduğunu göstermektedir (Erol ve ark.2014). Güney Şili'nin dört büyük bölgesinden toplanan 948 sığır örneğinde BVDV seroprevalanslarını belirlemek için yapılan serum nötralizasyon testinde; sürüdeki 700 ineğin $\geq 1:5$ titrede % 73.8'

nin seropozitif olduğu, boğalarda ise seropozitifliğin % 81.0 olduğunu bildirmiştir (Reinhardt ve ark. 1990). Polonya'da suni tohumlama boğalarından alınan kan numunelerinde boğaların % 86'sının nötralizan antikorlara sahip olduğu bildirmişlerdir. Ayrıca, analiz edilen kan örneklerinin % 0.9'unda persiste enfeksiyon (PI) saptanmıştır (Polak ve ark. 1999). Litvanya'da sığır sürülerinde BVDV enfeksiyonunun sığır popülasyonundaki varyasyonları belirlenmiştir. BVDV ile yıllık enfeksiyon riskinin hayvanlarda yaşın büyümesi ile azaldığı ve cinsiyetin de BVDV prevalansı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Mockeliuniene ve ark. 2004). Türkiye'de 1964 yılında Öncül ve ark. (1964); BVDV enfeksiyonunun ilk tespitini rapor etmişler. Ak ve ark.(2002) Trakya bölgesindeki sığırlarda enfeksiyonun prevalansını % 13,46, pesistantlığını % 25 saptamıştır. Burgu ve ark. (2003);Türkiyenin farklı bölgelerinde bulunan 26 süt sığırı işletmesinin tamamında enfeksiyonun varlığını tespit etmiş ve işletmelerdeki persiste enfeksiyon oranı ise %0.6 -0.83 olarak hesaplamıştır. Tan ve ark. (2006); Aydın ili çevresinde seropozitifliği %86, persistentliği %4.9 olarak saptamıştır. Erol ve ark. (2014); Afyonkarahisar, Burdur ve Denizli illerindeki küçük özel işletmelerden kan serum örneklerinde yaptıkları çalışmada sırasıyla % 84.6, % 35.7 ve % 42.8 seropozitiflik tespit etmişlerdir. Gürçay ve ark.(2013); Bingöl ilinde atık yapmış sığır fütüslerinin % 29.26'sında BVDV antijenini saptamıştır. Çalışmamızda Bingöl ve çevresinde halk elinde bulunan küçük işletmeleden sağlanan numunelerden yapıla çalışmada BVDV antijeni % 11.42, BVDV antikoru % 38.09 ve persiste enfeksiyon varlığı da % 2.85 oranında tespit edilmiştir. Cinsiyetin enfeksiyon oranını üzerine etkisi görülmemiştir. Yaşla seropozitiflik ve seronegatiflik değerler aralarındaki korelasyon testi uygulanmış, buna göre seronegatiflik yaşın artması ile birlikte artmıştır. Dünyada ve Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında prevalans ve persistantlık oranlarında uyum görülmektedir.

BVDV dünyada birçok sığır popülasyonda endemik bir hastalık olarak görülmektedir. Enfeksiyonun doğası nedeniyle, enfekte bir hayvanı tamamen tedavi etme imkânı yoktur. Evcil ya da yabani popülasyondaki PI hayvanlar virüsün önemli rezervuarı, yaşamları boyunca saçıcısı ve sürülerde yayıcısıdır. Birçok ülkede uygulanan tüm kontrol programları, büyük ölçüde PI hayvanlarının sürülere girmesini önleme, bir şekilde sürüye girmişse saptanması ve çıkarılması esasına dayanır. Sürü içi uygulamalarda PI hayvanlarının erken dönemde, özellikle de do-

ğumdan hemen sonra saptanması, BVDV'nin kontrol başarısı için önemlidir. Persiste enfeksiyonlarda, yaşamları boyunca saldıkları büyük miktarda viral partiküller nedeniyle enfekte hayvanların belirlenmesi, viral yayılmanın önlenmesi için iyi bir stratejidir (Greiser-Wilke ve ark 2003;Vargas ve ark 2009; Walz ve ark 2010). Bu çalışmada belirlenen persiste hayvanlar 20 günlük, 59 günlük ve 8 aylık yaşlarda görülmüştür. Ayrıca daha yaşlı hayvanlarda persistantlık durumu bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre persiste hayvanların hayata tutunma olasılıklarının daha düşük olduğu sonucu çıkarılabilir. Seropozitiflik oranları 6 aylık ve daha büyük hayvanlarda daha yüksek oranda bulunmuştur. Mockeliuniene ve ark. (2004); çalışmalarında seropozitiflik yüzdesinin yaşla birlikte arttığı bildirilmiştir. Ayrıca yaşla birlikte seropozitifliğin artması, sürüde persiste hayvanların varlığına işaret edebilir. Bingöl ve çevresindeki BVDV enfeksiyonunun seropozitifliği ve PI oranı değerlendirildiğinde enfeksiyonun yaygın olduğu değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, hastalığa karşı gerekli kontrol ve koruma önlemlerini almak bölge ve ülke ekonomisi adına gereklidir. Biyolojik güvenlik tedbirlerine ek olarak, PI hayvanların bulunması ve eradikasyonu hastalığın kontrolü için fazlasıyla önemlidir (Greiser-Wilke ve ark.2003; Walz ve ark.2010). BVDV enfeksiyonuna karşı aşılamayla bağışıklığı arttırmak en akılcı yöntemlerden biridir. Ancak, piyasada çeşitli inaktif BVDV aşılı bulunmasına rağmen, yetiştiriciler tarafından yeterli düzeyde uygulanmadığı alınan anamnez bilgilerinden anlaşılmıştır. Tüm bu bilgilerin ışığında, yapılan araştırma gerek yetiştiricilere, gerekse alanda çalışan veteriner hekimlere hastalığın yaygınlığını göstermiş, özellikle enfekte/persiste enfekte olan hayvanların eradikasyon çalışmalarına ışık tutacağı, dolaylı olarak ekonomiye destek sağlayacağı düşünülmüştür.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 09/01/2018-509 tarih sayılı ve Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 21.12.2017 tarih ve E.3276561 sayılı yazıları ile proje bazlı izinleri alınmıştır.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından, BAP- VF. 2018.00.001 proje numarası ile desteklenmiştir, yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

- Ak S, Fırat İ, Bozkurt HH, Gülyaz V, Ak K. (2002). The prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle and existence of persistently infected cattle in the Trakya Region. *Turk J Vet Anim Sci.* 26, 245-248.
- Alpay G, Toker EB, Yeşilbağ K. (2019). Persistent BVD virüs infections in offspring from imported heifers. *Trop Animal Health Prod.* 51, 297-302.
- Burgu İ, Alkan F, Özkul A, Yeşilbağ K, Karaoğlu T, Güngör B. (2003). Türkiye'de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 50, 127-133.
- Donis RO. (1995). Molecularbiology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. In: Ž. Baker JC, Houe H. Eds., *Bovine Viral Diarrhoea Virus*. Vet. Clin. North Am.: *Food Anim. Pract.* 11pp. 393-424.
- Duncan AJ, Gunn GJ, Humphry RW. (2016). Difficulties arising from the variety of testing schemes used for bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Vet Record.* 178, 292-292.
- Edgar RC. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high through put. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Erol N, Gür S, Acar A. (2014). A Serological investigation for Bovine Viral Diarrhoea Virus infection in and around Afyonkarahisar province West Anatolia. *Kocatepe Vet J.* 7, 17-21.
- Esen F. (2017) "Bingöl İli'nde Büyükbaş ve Küçükbaş Hayvancılık Faaliyetleri". *Bingöl Üni. Sos. Bil. Enst. Derg.* 7, 13, 83-100.
- Fray MD, Paton D J, Alenius S. (2000). The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci.* 60, 615-627.
- Greiser-Wilke I, Grummer B, Moennig V. (2003). Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals.* 31, 113-118.
- Gunn GJ, Saatkamp HW, Humphry RW, Stott AW. (2005) Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med.* 72, 149-162.
- Gürçay M, İssi M, Gül Y. (2013). Investigation of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle premises where abortions occur. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 10,2, 101-105.
- Houe H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.* 64, 89- 107.
- Houe H, Lindberg A, Moennig V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* 18, 427-436.
- Mockeliuniene V, Salomskas A, Mockeliunas R, Petkevicius S. (2004). Prevalence and epidemiological features of bovine viral diarrhoea virus infection in Lithuania. *Vet. Microbiol.* 99, 51-57.
- Oğuzoğlu TÇ, Koç B T, Coşkun N, Doğan F, Duran-Yelken S. (2019). Endless variety for bovine viral diarrhoea viruses: new members of a novel subgroup in a Pestivirus A from Turkey. *Trop Animal Health Prod.* 51, 1083-1087.
- Öncül S, Meriç İ, Korkut F. (1964). Türkiye'de ilk defa Lalahan Zooteknik Araştırma Enstitüsü Sığırlarında tespit edilen Mucosal Disease'in klinik yönü. *Lalahan Zoo Arş Enst Derg.* 4, 186-189.
- Polak MP, Zmudsinski JF. (1999). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet Microbiol.* 64, 253-257.
- Reinhardt G, Riedmann S, Ernst S, Aguilar M, Enriquez R, Gallardo J. (1990). Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea / Mucosal Disease in Southern Chile. *Prev Vet Med.* 10, 73-78.
- Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. (2017). A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet J.* 220, 80-87.
- Tan MT, Karaoğlu T, Erol N, Yıldırım Y. (2006). Serological and virological investigations of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın province. *Turk J Vet Anim Sc.* 30, 299-304.
- Vargas D, Jaime J, Vera V. (2009). Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). *Rev Colomb Cienc Pecu.* 22, 677-88.
- Walz PH, Grooms DL, Passler T, Ridpath JF, Tremblay R, Step DL, Callan RJ, Givens MD. (2010). Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Ruminants. *J Vet Intern Med.* 24, 476-486.
- Zimmer GM, Van Maanen C, De Goey I, Brinkhof J, Wentink GH. (2004). The effect of maternal antibodies on the detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood samples. *Vet. Microbiol.* 100, 145-149.



Van yöresinde koyun klinik mastitis olgularından izole edilen bakteri türlerinin prevalansı ve antimikrobiyel duyarlılıkları

Mehmet Salih Sercan Gökhan¹, Özgül Gülaydın²

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji AD, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Van, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.02.2020, Kabul tarihi / Accepted: 21.05.2020

Özet: Bu çalışmada, Van ve yöresinde koyunlarda mastitis olgularına neden olan bazı bakteriyel etkenlerin prevalansının ve antimikrobiyel duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonu otomatize bakteri identifikasyon cihazı ile yapılırken antimikrobiyel duyarlılığın belirlenmesinde disk difüzyon testi kullanıldı. Çalışmada 103 mastitisli süt örneğinin 51 (%49,51)'inden bakteriyel etken izole edilirken, örneklerin geri kalanında bakteriyel üremenin olmadığı görüldü. Araştırmada en fazla izole edilen bakteriyel etkenlerin sırasıyla *Pseudomonas* spp. (%27,1), *Mannheimia haemolytica* (%16,94), *Staphylococcus* spp. (%13,55) ve *Streptococcus pneumoniae* (%11,86) olduğu belirlendi. Bununla birlikte Gram negatif bakteriyel etkenlerin sırasıyla %72,2, %52,8, %42,2, %25, %50 ve %50'sinin penisilin, sefoksitin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametaksazol, tilmikosin ve eritromisine dirençli olduğu belirlendi. Gram pozitif bakteriyel etkenlerin ise metisilin, sefoksitin, enrofloksasin, tilmikosin, eritromisin ve gentamisine sırasıyla %21,7, %43,4, %8,7, %8,7, %8,7 ve %4,3'ü dirençli bulundu. Sonuç olarak bu çalışmada koyunlarda mastitis olgularında Gram pozitif bakteriyel etkenlerin yanı sıra *Pseudomonas* spp. ve *Mannheimia haemolytica* izolatlarının da önemli rol oynayabileceği gözlemlendi. Bununla birlikte Van ve yöresinde koyunlarda mastitis vakalarının tedavisinde penisilin, sefoksitin, tetrasiklin, tilmikosin ve eritromisin kullanımına dikkat edilmesi gerektiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel duyarlılık, koyun, mastitis, prevalans

Prevalance and antimicrobial susceptibility of bacterial species isolated from ovine clinical mastitis cases in Van province

The aim of this study was to determine the prevalence and antimicrobial susceptibility of some bacterial agents causing mastitis in sheep in Van province. Identification of isolated agents at species level was performed by automated bacteria identification system and disc diffusion test was used to determine the antimicrobial susceptibility. In the study, bacterial agent was isolated from 51 (49.51%) of 103 milk samples, while no bacterial growth was in the rest of the samples. It was determined that *Pseudomonas* spp. (27.1%), *Mannheimia haemolytica* (16.94%), *Staphylococcus* spp. (13.55%) and *Streptococcus pneumoniae* (11.86%) were mostly isolated bacterial agents. In addition, 72.2%, 52.8%, 42.2%, 25% and 50% of Gram negative bacterial agents were resistant to penicillin, cefoxitin, tetracycline, co-trimoxazole, tilmicosin and erythromycin, respectively. Also, 21.7%, 43.4%, 8.7%, 8.7% and 4.3% of Gram positive bacterial agents were resistant to methicillin, cefoxitin, enrofloxacin, tilmicosin, erythromycin and gentamicin, respectively. In conclusion, it was observed that *Pseudomonas* spp. and *Mannheimia haemolytica* isolates could play an important role in mastitis cases in sheep as well as Gram positive bacterial agents. Additionally, it was determined that the use of penicillin, cefoxitin, tetracycline, tilmicosin and erythromycin should be considered in the treatment of mastitis in sheep in Van province.

Key words: Antimicrobial susceptibility, mastitis, prevalence, sheep

Giriş

Mastitis, meme dokusunda görülen yangısal reaksiyonlar ile sütün fiziksel ve kimyasal yapısındaki değişimlerle karakterize bir enfeksiyondur (Sasshofer ve ark. 1987). Grekçe meme anlamına gelen "mastos" ve yangı anlamına gelen "itis" kelimelerinden oluşmaktadır (Kesenkaş 1999; Yağcı 2008). Mastitisler, meme loblarında değişen derecede klinik semptomların gözlemlendiği klinik mastitis ya da klinik semptomların sütte fiziksel herhangi bir değişikliğin fark edil-

mediği subklinik mastitis şeklinde seyredabilmektedir (Manser 1986; Contreras ve ark. 1999).

Mastitis, süt kalitesinde ve miktarında azalma ile birlikte antibiyotik kullanımına ve veteriner hekim hizmetlerine bağlı olarak artan maliyetler nedeniyle süt yönlü koyun yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Sabuncuoğlu ve Çoban 2006). Bununla birlikte mastitis olgularının sık görüldüğü sürülerde anaç koyunların kuzulara yeterince

Yazışma adresi / Correspondence: Özgül Gülaydın, Van Yüzüncü Yıl Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD, Tuşba, Van
E-posta: ozgulgulaydin@yyu.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-0397-7418 • ²0000-0001-8376-2008

kolostrum sağlayamaması sonucunda kuzularda düşük canlı ağırlık gözlenmekte ve neonatal enfeksiyonların görülme oranı da artmaktadır (Mørk ve ark. 2007).

Mastitislerin tanısında kullanılan teşhis yöntemleri hastalığın seyrine göre değişmektedir (Yağcı 2008). Klinik mastitislerde memelerin ve sütün klinik, fiziksel ve bakteriyolojik muayenesi yapılırken özellikle subklinik mastitislerin teşhisinde somatik hücre sayımı, sütün elektriksel iletkenliğinin ölçülmesi ve sütteki enzimlerin ölçülmesi esasına dayalı olan biyokimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Yağcı 2008; Gelasakis ve ark. 2015). Ancak hastalığın teşhisi ve etiolojisinin belirlenmesinde mikrobiyolojik teşhis metotları altın standart olarak kabul edilmektedir (Fragkou ve ark. 2014; Gelasakis ve ark. 2015).

Yapılan çalışmalarda koyunlarda mastitise *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Mannheimia* spp., *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp. ve *Corynebacterium* spp. gibi bakteriyel etkenlerin sebep olduğu bildirilmiştir (Gelasakis ve ark. 2015). Bununla birlikte *Clostridium* spp. (Mørk ve ark. 2007; Fotou ve ark. 2011), *Enterococcus* spp. (Marogna ve ark. 2010), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) (Winter ve ark. 2004; Brugère-Picoux 2008), *Micrococcus* spp. (Ariznabarreta ve ark. 2002), *Mycobacterium* spp. (Nebbia ve ark. 2006) ve *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) (Saratsis ve ark. 1998; Hadimli ve ark. 2010) gibi bakteriyel etkenlerin de mastitis olgularından izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir.

Ülkemizde, sığırlardaki subklinik ve klinik mastitis olgularından çeşitli bakteriyel etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu, antimikrobiyel duyarlılıkları ve virülens faktörleri ile birlikte bazı fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Gülcü ve Ertaş 2004; Tel ve ark. 2009; Türkyılmaz ve ark. 2010; Dinç ve ark. 2012; Gökdağ 2017; Kurt 2018; Özdemir 2018; Erdoğan 2019; Sur 2019). Bazı araştırmacılar da keçilerde görülen mastitis vakalarında bakteriyel ve mikotik etkenlerin antimikrobiyel ve antimikotik ajanlara karşı duyarlılıklarını belirlemişlerdir (İşnel Ceylan 2009; Uçan 2014; Koltaş 2016). Ancak koyunlarda özellikle klinik mastitis olgularına neden olan etkenlerin kapsamının ve antimikrobiyel duyarlılıklarının belirlendiği araştırmaya daha az oranda rastlanmıştır (Batu ve Fırat 1981; Baysal ve Kenar 1989; Erganiş ve ark. 1995).

Bu çalışmada ise Van yöresinde koyunlarda klinik mastitis vakalarından izole edilen bazı bakteriyel etkenlerin prevalansının ve antimikrobiyel duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Gereç

Bu çalışmada, Temmuz 2019-Eylül 2019 tarihleri arasında Van ili ve çevresinde yetiştiriciliği yapılan ve klinik olarak mastitis tanısı koyulan değişik ırk ve yaştaki koyunlardan alınan 103 adet mastitisli süt örneği kullanıldı. Örnekler, aseptik koşullarda steril tüplere alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Çalışmada kullanılan mastitisli süt örnekleri Van iline bağlı 5 farklı ilçe ve bunlara bağlı 20 farklı köy ile 23 farklı çiftlikten toplandı (Tablo 1). Numunelerin toplanabilmesi için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2019/6 nolu kararı ile onay alındı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mastitisli süt örneklerinin Van iline bağlı ilçe ve köylere göre dağılımı.

Çiftlik No	İlçe	Köy	Örnek Sayısı (n:103)
1	Tuşba	Erçek	2
2	Tuşba	Göllü	8
3	Tuşba	Göllü	2
4	Tuşba	Avirek	4
5	Tuşba	Gedelova	6
6	İpekyolu	Beşçatak	5
7	İpekyolu	Güvelek	4
8	Edremit	Kurubaş	7
9	Gürpınar	Geçerli	3
10	Gürpınar	Otbiçer	11
11	Gürpınar	Otbiçer	4
12	Gürpınar	Geziyurt	2
13	Gürpınar	Günbaşı	2
14	Gürpınar	Çörekli	2
15	Gürpınar	Sevindik	2
16	Gürpınar	Bolyanık	8
17	Gürpınar	Cevizalan	6
18	Gürpınar	Koçgüden	5
19	Gürpınar	Koçgüden	4
20	Gürpınar	Yoldüştü	3
21	Gürpınar	Muratlı	3
22	Başkale	Güvendi	4
23	Başkale	Oğullu	6

Bakteri izolasyonu ve identifikasyonu

Mastitisli süt örnekleri vorteks ile homojenize edildikten sonra öze ile %5 defibrine koyun kanı katılmış kanlı agar besiyeri (Oxoid, CM0271, İngiltere), MacConkey Agar (Merck, 1.05465, Almanya), Mannitol Salt Agar (Oxoid, CM85, İngiltere) ve Slanetz Bartley Medium (Oxoid, CM0377, İngiltere) besiyerlerine ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de aerobik ortamda 24-48 saat inkübe edildi. İzolatlar, Gram

boyama, morfolojik özellik, katalaz ve oksidaz reaksiyonları ile selektif besiyerinde üreme özelliklerine göre değerlendirildi (Quinn ve ark. 2011).

İzolatların tür düzeyinde identifikasyonları otomatize bakteri tanımlama cihazı (BD Phoenix, Amerika Birleşik Devletleri) ile yapıldı. Bu amaçla Gram pozitif olduğu belirlenen izolatların identifikasyonunda BD Phoenix™ PMIC / D-87 paneli; Gram negatifler için BD Phoenix™ NMIC / D-400 paneli kullanıldı. Testin yapılışı ve değerlendirilmesinde üretici firma önerileri dikkate alındı (Anonim 2006).

Antimikrobiyel duyarlılığın belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyel duyarlılıkları Bauer ve ark.'nın (1966) bildirdiği disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Antimikrobiyel duyarlılığın belirlenmesinde Gram pozitif bakteriyel etkenler için; penisilin G (P, 10 units, Oxoid), metisilin (MET, 10 mcg, Oxoid), sefoksitin (CX, 30 mcg, Himedia), vankomisin (VA, 30 mcg, Oxoid), tetrasiklin (TE, 30 mcg, Himedia), trimetoprim-sulfametaksazol (COT, 23.75/1.25 mcg, Himedia), eritromisin (E, 15 mcg, Oxoid), tilmikosin (TIL, 15 mcg, Bioanalyse), enrofloksasin (ENR, 5 mcg, Oxoid) ve gentamisin (CN, 10 mcg, Oxoid); Gram negatif bakteriyel etkenler için ise penisilin G (P, 10 units, Oxoid), sefoksitin (CX, 30 mcg, Himedia), tetrasiklin (TE, 30 mcg, Himedia), trimetoprim-sulfametaksazol (COT, 23.75/1.25 mcg, Himedia), eritromisin (E, 15 mcg, Oxoid), tilmikosin (TIL, 15 mcg, Bioanalyse), enrofloksasin (ENR, 5 mcg, Oxoid) ve gentamisin (CN, 10 mcg, Oxoid) antibiyotik diskleri kullanıldı. Testin değerlendirilmesinde Clinical Laboratory Standards Institute ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing kriterleri dikkate alındı (CLSI 2002, 2018; EUCAST 2019). Antimikrobiyel duyarlılık sonuçları duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi. Buna göre, en az üç farklı grupta sınıflandırılan antimikrobiyel maddelerden bir ya da daha fazlasına direnç tespit edilmesi çoklu antibiyotik direnci olarak kabul edildi (Magiorakos ve ark. 2012). Testin yapılışında kontrol olarak *E. coli* ATCC® 25922, *S. aureus* ATCC® 25923 ve *S. pneumoniae* ATCC® 49619 referans suşları kullanıldı.

Bulgular

İzolasyon ve identifikasyon

Klinik olarak mastitis teşhisi koyulan koyunlardan alınan 103 adet süt örneğinin 51 (%49,51)'inde bakteriyel etken izole edilirken, 52 (%50,48) örnekte ise üremenin olmadığı görüldü. Bakteriyel üremenin görüldüğü 51 örneğin 8 (%15,68)'inde iki farklı etken izole edilerek toplam 59 adet izolat elde edildi.

Mastitisli süt örneklerinden izole edilen 59 adet bakteriyel etkenin 36 (%61)'isinin Gram negatif çomak, 23 (%39)'ünün de Gram pozitif kok olduğu belirlendi.

Mastitisli 103 adet süt örneğinden 16 (%15,53) *Pseudomonas* spp. (8 adet *Pseudomonas oryzihabitans* (*P. oryzihabitans*), 4 adet *Pseudomonas putida* (*P. putida*), 2 adet *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), 1 adet *Pseudomonas luteola* (*P. luteola*) ve 1 adet *Pseudomonas* spp.), 10 (%9,70) *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), 4 (%3,88) *Citrobacter freundii* (*C. freundii*), 2 (%1,94) *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), 2 (%1,94) *Archromobacter* spp., 1 (%0,97) *Serratia plymuthica* (*S. plymuthica*), 1 (%0,97) *Weeksella virosa* (*W. virosa*), 7 (%6,79) *S. pneumoniae*, 4 (%3,88) *Staphylococcus simulans* (*S. simulans*), 3 (%2,91) *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), 1 (%0,97) *S. aureus*, 4 (%3,88) *Aerococcus viridans* (*A. viridans*), 2 (%1,94) *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) ve 2 (%1,94) *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) identifiye edildi (Tablo 2).

Yapılan değerlendirmede en fazla izole edilen Gram negatif bakteriyel etkenin *Pseudomonas* spp. (%15,53) olduğu ve bunu *M. haemolytica* (%9,70) izolatlarının izlediği gözlenirken; Gram pozitif koklar arasında en sık izole edilen etkenin *Staphylococcus* spp. (%7,76) ve *S. pneumoniae* (%6,79) olduğu belirlendi.

Tablo 2. Mastitisli süt örneklerinden izole edilen bakteriyel etkenlerin dağılımı.

İzolat	n	%
Gram negatif		
<i>P. oryzihabitans</i>	8	7,76
<i>P. putida</i>	4	3,88
<i>P. fluorescens</i>	2	1,94
<i>P. luteola</i>	1	0,97
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0,97
<i>M. haemolytica</i>	10	9,70
<i>C. freundii</i>	4	3,88
<i>K. pneumoniae</i>	2	1,94
<i>Archromobacter</i> spp.	2	1,94
<i>S. plymuthica</i>	1	0,97
<i>W. virosa</i>	1	0,97
Toplam	36	34,95
Gram pozitif		
<i>S. pneumoniae</i>	7	6,79
<i>S. simulans</i>	4	3,88
<i>S. epidermidis</i>	3	2,91
<i>S. aureus</i>	1	0,97
<i>A. viridans</i>	4	3,88
<i>E. faecium</i>	2	1,94
<i>E. hirae</i>	2	1,94
Toplam	23	22,33

Antimikrobiyel duyarlılık

Gram negatif izolatların tümü enrofloksasin ve gentamisine duyarlı, penisilin, sefoksitin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametaksazol, tilmikosin ve eritromisine ise izolatların sırasıyla %72,2, %52,8, %42,2, %25, %50 ve %50'si dirençli bulundu (Tablo 3). Gram pozitif izolatların ise tümü penisilin, vankomisin, tetrasiklin ve trimetoprim-sulfametaksazole duyarlı bulundu. İzolatların %21,7, %43,4, %8,7, %8,7, %8,7 ve %4,3'ü sırasıyla metisilin, sefoksitin, enrofloksa-

sin, tilmikosin, eritromisin ve gentamisine dirençli bulundu (Tablo 4).

Araştırmada *Enterobacteriaceae* ve non-*Enterobacteriaceae* izolatlarının tamamında; *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. ve *Aerococcus* spp. izolatlarının ise %50'sinde çoklu antibiyotik direnci tespit edildi. İzolatlarda belirlenen çoklu antibiyotik direnç profili Tablo 5'de gösterildi. *M. haemolytica*, *Staphylococcus* spp. ve *S. pneumoniae* izolatlarında ise çoklu antibiyotik direnci tespit edilmedi.

Tablo 3. Gram negatif bakteriyel izolatların disk difüzyon test sonuçları dağılımı.

Etken Madde	<i>Pseudomonas</i> spp.* (n:16)			<i>M. haemolytica</i> ** (n:10)			<i>Enterobacteriaceae</i> *** (n:7)			Non- <i>Enterobacteriaceae</i> **** (n:3)			Toplam (n:36)
	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	R n (%)
P	-	-	16 (100)	10 (100)	-	-	-	-	7 (100)	-	-	3 (100)	26 (72,2)
CX	-	-	16 (100)	10 (100)	-	-	7 (100)	-	-	-	-	3 (100)	19 (52,8)
TE	10 (62,50)	-	6 (37,5)	-	-	10 (100)	6 (85,71)	1 (14,28)	-	2 (66,66)	-	1 (33,33)	17 (42,2)
ENR	15 (93,75)	1 (6,25)	0	10 (100)	-	-	7 (100)	-	-	3 (100)	-	-	-
COT	10 (62,5)	-	6 (37,5)	10 (100)	-	-	7 (100)	-	-	-	-	3 (100)	9 (25)
TIL	8 (50)	-	8 (50)	10 (100)	-	-	-	-	7 (100)	-	-	3 (100)	18 (50)
E	8 (50)	-	8 (50)	3 (30)	7 (70)	-	-	-	7 (100)	-	-	3 (100)	18 (50)
CN	16 (100)	-	-	10 (100)	-	-	7 (100)	-	-	3 (100)	-	-	-

P: Penisilin, CX: Sefoksitin, TE: Tetrasiklin, ENR: Enrofloksasin, COT: Trimetoprim-Sulfametaksazol, TIL: Tilmikosin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin
*: P, CX, TE ve COT için EUCAST (2019) *P. multocida* değerlendirme kriteri, TIL için CLSI (2018) *P. multocida* değerlendirme kriteri, E için CLSI (2002) *P. multocida* değerlendirme kriteri, ENR ve CN için ise CLSI (2018) *P. aeruginosa* değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

***: P, CX, TE, ENR ve COT için EUCAST (2019) *P. multocida* değerlendirme kriteri, TIL için CLSI (2018) değerlendirme kriteri, E ve CN için CLSI (2002) değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

***: P, TIL ve E için CLSI (2002), CX için EUCAST (2019), TE, ENR, COT ve CN için CLSI (2018) değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

****: *Pseudomonas* spp. için kullanılan değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

Tablo 4. Gram pozitif bakteriyel izolatların disk difüzyon test sonuçları dağılımı.

Etken Madde	<i>S. pneumoniae</i> * (n:7)			<i>Staphylococcus</i> spp.** (n:8)			<i>Enterococcus</i> spp.*** (n:4)			<i>A. viridans</i> **** (n:4)			Toplam (n:23)
	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	R n (%)
P	7 (100)	-	-	8 (100)	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	-	-	-
MET	7 (100)	-	-	8 (100)	-	-	-	-	4 (100)	3 (75)	-	1 (25)	5 (21,7)
VA	7 (100)	-	-	8 (100)	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	-	-	-
CX	5 (71,42)	-	2 (28,57)	8 (100)	-	-	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	10 (43,4)
TE	5 (71,42)	2 (28,57)	-	8 (100)	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	-	-	-
ENR	3 (42,85)	4 (57,14)	-	8 (100)	-	-	-	2 (50)	2 (50)	-	4 (100)	-	2 (8,7)
COT	7 (100)	-	-	8 (100)	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	-	-	-
TIL	5 (71,42)	2 (2,57)	-	6 (75)	2 (25)	-	-	4 (100)	-	-	2 (50)	2 (50)	2 (8,7)
E	7 (100)	-	-	8 (100)	-	-	1 (25)	3 (75)	-	2 (50)	-	2 (50)	2 (8,7)
CN	7 (100)	-	-	8 (100)	-	-	4 (100)	-	-	3 (75)	-	1 (25)	1 (4,3)

P: Penisilin, CX: Sefoksitin, TE: Tetrasiklin, ENR: Enrofloksasin, COT: Trimetoprim-Sulfametaksazol, TIL: Tilmikosin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin
*: P, MET, ve COT için CLSI (2002), VA, TE, ENR, TIL ve E için CLSI (2018), CX ve CN için CLSI (2018) *Staphylococcus* spp. değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

***: P, MET, CX, TE, ENR, COT, TIL, E ve CN için CLSI (2018), VA için CLSI (2002) değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

****: P, TE, TIL ve E için CLSI (2018), MET, VA, CX ve ENR için CLSI (2018) *Staphylococcus* spp., COT için EUCAST (2019) ve CN için CLSI (2002)'de bildirilen değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

****: P ve VA için EUCAST (2019), CN için CLSI (2002), MET, CX, TE, ENR, COT, TIL ve E için *Enterococcus* spp. için kullanılan değerlendirme kriterleri dikkate alındı.

Tablo 5. İzole edilen bakterilerin çoklu antibiyotik direnç profilleri.

İzolat	n (%)	Antibiyotikler
<i>Pseudomonas</i> spp.	5 (31,25)	P, CX, TE, COT, TİL, E
	1 (6,25)	P, CX, TE, TİL, E
	1 (6,25)	P, CX, TİL, E
	1 (6,25)	P, CX, COT, TİL, E
<i>Enterobacteriaceae</i>	7 (100)	P, TİL, E
Non- <i>Enterobacteriaceae</i>	2 (66,66)	P, CX, COT, TİL, E
	1 (33,33)	P, CX, TE, COT, TİL, E
<i>Enterococcus</i> spp.	2 (50)	MET, CX, ENR
<i>Aerococcus</i> spp.	1 (25)	MET, CX, TİL, E
	1 (25)	CX, TİL, E, CN

P:Penisilin, CX: Sefoksitin, TE: Tetrasiklin, ENR: Enrofloksasin, COT: Trimetoprim-Sulfametaksazol, TİL: Tilmikosin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin

Tartışma ve Sonuç

Koyunlarda mastitis olguları, süt kalitesi ile veriminde azalmaya ve beslenme problemleri nedeniyle canlı kuzu ağırlığında düşüşe neden olarak hem süt hem de et yönlü yetiştiricilik yapılan sürülerde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Mørk ve ark. 2007; Gelasakis ve ark. 2015). Klinik mastitis, koyunlarda huzursuzluk, depresyon, yem tüketiminde azalma, ağrı ve ateş gibi klinik semptomlara neden olarak hayvan refahını da olumsuz yönde etkilemektedir. Subklinik mastitis olgularında ise sütte makroskopik olarak bir değişim gözlenmemesine rağmen klinik mastitislere benzer şekilde hayvan refahı ve davranışları olumsuz yönde etkilenmektedir (Fthenakis ve Jones, 1990; Yağcı, 2008). Koyunlarda klinik mastitislerin görülme sıklığının %5 civarında olduğu bilinmekle birlikte subklinik mastitis vakalarının sürülerde oldukça yüksek (%50) oranlarda seyredildiği bildirilmiştir (Contreras ve ark. 2007).

Hayvan sayısı ve süt veriminin fazla olması nedeniyle sığırlarda görülen mastitis olgularıyla ilgili daha fazla çalışmaya rastlanmaktadır (Gülcü ve Ertaş 2004; Tel ve ark. 2009; Türkyılmaz ve ark. 2010; Aslantaş ve ark. 2011; Büyükcangaz ve ark. 2012; Dinç ve ark. 2012; Li ve ark. 2015; Bahramina ve ark. 2017; Dan ve ark. 2019). Ancak son zamanlarda koyun popülasyonundaki ve yetiştiriciliğindeki artış ile birlikte koyunlarda da mastitis olgularıyla ilgili yapılan çalışmaların sayısı hem ulusal hem de uluslararası alanda artış göstermektedir (Gelasakis ve ark. 2015).

Ülkemizde koyun ve keçilerde görülen mastitis olgularının ele alındığı çeşitli lisansüstü tez çalışmaları ve bireysel araştırmalar bulunmaktadır (Batu

ve Fırat 1981; Baysal ve Kenar 1989; Erganiş ve ark. 1995; İşnel Ceylan 2009; Uçan 2014; Koltaş 2016). Ancak yakın zamanda Van ve yöresinde koyunlarda klinik mastitise neden olan bakteriyel etkenlerin sıklığının ve antimikrobiyel duyarlılığının araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Van ve yöresinde koyunlarda görülen klinik mastitis olgularından izole edilen bakteriyel etkenlerin prevalansı ve antimikrobiyel duyarlılıkları araştırıldı.

Birçok bakteriyel etken koyunlarda klinik ve subklinik mastitis olgularına neden olmaktadır ve bu etkenlerin teşhisinde genel olarak konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır (Contreras ve ark. 2007; Olechnowicz ve Jaśkowski 2014; Gelasakis ve ark. 2015). Bununla birlikte mastitis etiolojisinde yetiştiricilik yönünün önemli bir faktör olduğu, süt yönlü yetiştiricilik yapılan sürülerde *S. aureus* ve diğer *Staphylococcus* spp. izolatlarının (Bergoiner ve ark. 2003; Contreras ve ark. 2007; Mørk ve ark. 2007), et yönlü yetiştiricilik yapılan sürülerde ise daha çok *M. haemolytica* ve *S. aureus* izolatlarının mastitis vakalarından sorumlu olduğu belirlenmiştir (Gelasakis ve ark. 2015). Koyunlarda mastitis olgularının etiolojisinin tespitine yönelik çalışmalarda *M. haemolytica* prevalansı oldukça yüksek (%48-65) bulunsa da (Koop ve ark. 2010; Omaleki ve ark. 2010) bazı araştırmacılar bu oranın %1-26 arasında sınırlı kaldığını bildirmişlerdir (Gülcü ve Öngör 2002; Mavrogianni ve ark. 2007; Arsenault ve ark. 2008). Sunulan bu çalışmada ise *M. haemolytica* prevalansının %9,70 olduğu tespit edildi ve bu durumun mastitisli süt örneklerinin daha çok süt yönlü yetiştiricilik yapılan sürülerden toplanması ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Staphylococcus spp. izolatları koyun mastitislerinde en sık teşhis edilen etkenlerdir (Olechnowicz ve Jaśkowski 2014). Özellikle *S. aureus* suşları hem sporadik mastitis olgularından hem de sürülerde salgın şeklinde seyreden vakalardan sorumlu tutulmaktadır (Bergoiner ve ark. 2003). Birçok araştırmacı koyun mastitislerinde %13-80 arasında değişen oranlarda *S. aureus* izole ve tanıya ettiklerini bildirmişlerdir (Batu ve Fırat 1981; Erganiş ve ark. 1995; Jones ve Watkins 1998; Gülcü ve Öngör 2002; Mørk ve ark. 2007; Koop ve ark. 2010; Mavrogianni ve ark. 2011; Dore ve ark. 2016; Abdulhamed ve ark. 2018). Bununla birlikte koagülaz negatif *Staphylococcus* türleri de koyunlarda hem klinik hem de subklinik mastitis olgularında önemli rol oynamaktadır ve bu türler içinde *S. epidermidis*, *S. simulans* ve *S. chromogenes* izolatları daha yüksek oranda tanıya edilmektedir. Yapılan çalışmalarda koyunlarda mastitis olgularından koagülaz negatif *Staphylococcus* türlerinin

izolasyon oranının da oldukça yüksek (%40-70) bulunduğunu belirtilmiştir (Erganiş ve ark. 1995; Dore ve ark. 2016; Ceniti ve ark. 2017; Queiroga 2017). Bazı araştırmacılar ise bu oranı daha düşük olarak belirlemişlerdir (Gülcü ve Öngör 2002; Onnosch ve ark. 2002; Dore ve ark. 2016). Sunulan bu çalışmada mastitisli süt örneklerinden %0,97 oranında *S. aureus* izole edilirken, koagülaz negatif türlerin (*S. simulans* ve *S. epidermidis*) izolasyon oranının %3 olduğu ve elde edilen verilerin daha önce yapılan çalışmalara göre oldukça düşük bulunduğunu gözlemlendi.

Streptococcus spp. izolatlarının genel olarak çiftlikteki hijyen eksikliklerine bağlı olarak sporadik mastitis vakalarına neden olduğu bilinmektedir (Zdragos ve ark. 2005; Contreras ve Rodriguez 2011). Koyun mastitislerinde *Streptococcus* spp. prevalansını Dore ve ark. (2016) %3,6, Ceniti ve ark. (2017) %7,95, Queiroga (2017) %14,3, Abdulhamed ve ark. (2018) %5,6 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise diğer çalışmalara benzer şekilde süt örneklerinin %6,79'unda *S. pneumoniae* identifiye edildi. Ancak; İtalya ve Almanya'da yapılan çalışmalarda *Streptococcus* türlerinin mastitisli koyun sütlerinden daha yüksek (%23-31) oranda izole edildiği rapor edilmiştir (Marogna ve ark. 2010; Cuccuru ve ark. 2011; Kern ve ark. 2013).

Citrobacter spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *P. aeruginosa* vb. Gram negatif etkenler de koyun sütlerinden izole ve identifiye edilebilmekle birlikte bu etkenler hayvanın immun sistem yanıtına göre klinik mastitislere neden olabilen çevresel etkenler olarak kabul edilmektedir (Contreras ve Rodríguez, 2011). Dore ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada %3,8 oranında *Enterobacteriaceae*, %4,3 oranında *Pseudomonas* spp., Abdulhamed ve ark. (2018) %3,77 oranında *Klebsiella* spp., %1,89 oranında *Pseudomonas* spp., Queiroga (2017) ise %3,6 oranında *P. aeruginosa* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmada ise yapılan çalışmalardan farklı olarak *Pseudomonas* spp. izolatlarının prevalansı %15,53 olarak tespit edildi. *Enterobacteriaceae* izolatları ise diğer çalışmalara benzer şekilde mastitisli süt örneklerinin %1-3'ünden izole edildi. Van ve yöresinde özellikle yaz aylarında koyun sürülerinin daha çok yüksek meralarda otlatılması ve meme uçlarının çevrede ve toprakta bol bulunabilen *Pseudomonas* spp. etkenleri ile olası kontaminasyonun mastitise neden olmuş olabileceği düşünüldü.

Koyunlarda meme enfeksiyonlarının kontrol ve tedavisinde kuru dönem terapisinin önem arz ettiği vurgulanmaktadır (Fthenakis ve ark. 2012). Ancak etkin tedavi protokolü ile ilgili detaylı bilgi bulunmamakla birlikte spesifik olarak koyun mastitisleri-

ne yönelik sınırlı sayıda kemoteröpatik madde bulunmaktadır (Gelasakis ve ark. 2015). Özellikle son yıllarda bilinçsiz antibiyotik kullanımına bağlı olarak insan tüketimine sunulan hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntısının bulunması ve dirençli bakteri sayısındaki artış, mastitis olgularında mikrobiyolojik teşhis ve antimikrobiyel duyarlılık testlerinin önemi arttırmaktadır (Petridis ve Fthenakis 2014). Bu kapsamda koyunlarda mastitis etiyojisine yönelik daha fazla çalışma olmasına rağmen, izolatlarda antimikrobiyel duyarlılığın belirlendiği sınırlı sayıda araştırma bulunmakta ve konu ile ilgili çalışmaların daha çok *Staphylococcus* spp. izolatlarına yönelik olduğu görülmektedir (Fthenakis 1998; Lollai ve ark. 2008; Onni ve ark. 2011; Azara ve ark. 2017; Obaidat ve ark. 2018).

Koyunlarda mastitis olgularından izole edilen *S. aureus*, *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. izolatlarının antimikrobiyel duyarlılığının belirlendiği çalışmalarda penisilin dirençli suş sayısının genel olarak düşük olduğu bildirilirken (Lollai ve ark. 2008; Azara ve ark. 2017; Ceniti ve ark. 2017) bazı araştırmacılar ise *Staphylococcus* türlerinde penisilin dirençli izolat sayısının %65'e ulaşabildiğini rapor etmişlerdir (Fthenakis 1998; Onni ve ark. 2011; Abdulhamed ve ark. 2018). Araştırmalarda metisilin dirençli *Staphylococcus* spp. prevalansının koyun mastitislerinde oldukça düşük (%1) olduğu ancak, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, eritromisin ve gentamisine dirençli Gram pozitif izolat sayısının farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Fthenakis 1998; Onni ve ark. 2011; Azara ve ark. 2017; Ceniti ve ark. 2017; Abdulhamed ve ark. 2018; Obaidat ve ark. 2018). Benzer şekilde sunulan bu çalışmada da elde edilen Gram pozitif izolatlarda antimikrobiyel dirençli suş sayısının düşük olduğu görüldü. *Staphylococcus* spp. izolatlarında metisilin dirençli suşlara rastlanmazken, penisilin Gram pozitif etkenler üzerinde etkili olduğu belirlendi. Bununla birlikte etkenlerin büyük çoğunluğu tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, eritromisin ve gentamisine duyarlı bulundu. Gram negatif bakteriyel etkenlerin penisilin, sefoksitin, tetrasiklin, tilmikosin ve eritromisine sırasıyla %72,2, %52,8, %42,2, %50 ve %50'sinin dirençli olduğu tespit edilirken, gentamisinin Gram negatif etkenlerin neden olduğu mastitis olgularında etkili olabileceği görüldü. Gentamisin ile ilgili elde edilen verilerin Abdulhamed ve ark. (2018) tarafından rapor edilen bulgular ile uyumlu olduğu belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada Van ve yöresinde koyunlarda mastitis olgularında Gram pozitif bakteriyel etkenler ile birlikte Gram negatif bakteriyel

etkenlerin de önemli rol oynayabileceği gözlemlendi. Özellikle *Pseudomonas* spp. ve *M. haemolytica* suşlarının koyun klinik mastitislerinde göz önünde bulundurulması ve Van yöresinde koyunlarda mastitis vakalarının tedavisinde penisilin, sefoksitin, tetrasiklin, tilmikosin ve eritromisin kullanımına dikkat edilmesi gerektiği belirlendi. Çalışmadan elde edilen verilerin bölgede küçükbaş hayvanlarda görülen mastitis vakalarının etiyolojisi, etkin tedavi stratejilerinin belirlenmesi ve hastalığın kontrolüne ilişkin çalışmalara önemli katkı sağlayacağı düşünüldü.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2019/6 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Teşekkür: Bu çalışma, ilk yazarın aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-8493 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdalhamed AM, Zeedan GSG, Zeina HAAA. (2018) Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. *Vet World*. 11(3), 355-362.
- Anonim. (2006) BD Phoenix System user's manuel. Maryland: Becton, Dickinson and Company.
- Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F. (2002) Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to *Staphylococci*. *J Dairy Sci*. 85, 1370-1375.
- Arsenault J, Dubreuil P, Higgins R, Belanger D. (2008) Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat producing sheep flocks in Quebec, Canada. *Prev Vet Med*. 87, 373-393.
- Aslantaş Ö, Öztürk F, Ceylan A. (2011) Prevalence and molecular mechanism of macrolide and lincosamide resistance in *Staphylococci* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *J Vet Med Sci*. 73(12), 1645-1648.
- Azara E, Piras MG, Parisi A, Tola S. (2017) Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates collected between 1986 and 2015 from ovine mastitis. *Vet Microbiol*. 205, 53-56.
- Bahraminia F, Emadi SR, Emaneini M, Farzaneh N, Rad M, Khoramian B. (2017) A high prevalence of tylosin resistance among *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Vet Res Forum*. 8(2), 121-125.
- Batu A, Fırat G. (1981) Trakya ve Marmara bölgesinde koyunlarda klinik ve subklinik mastitisler ve etkenleri üzerinde araştırma. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*. 13(1), 11-21.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*. 45, 493-494.
- Baysal T, Kenar B. (1989) Konya ve yöresindeki koyunlarda klinik ve subklinik mastitis olgularından aerob etken izolasyon ve identifikasyonu. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*. 6(4), 55-66.
- Bergonier D, Crémoux RD, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res*. 34, 689-716.
- Brugère-Picoux J. (2008) Ovine listeriosis. *Small Ruminant Res*. 76, 12-20.
- Büyükcangaz E, Mat B, Khider Abd Alrahim Ahmed M. (2012) Subklinik mastitisli sığır sütlerinin mikrobiyolojik analizi ve izolatların antimikrobiyal direnç profili. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*. 31(2), 35-44.
- Ceniti C, Britti D, Santoro AML, Musarella R, Ciambone L, Casalnuovo F, Costanzo N. (2017) Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals. *IJFS*. 6, 84-87.
- CLSI. (2002) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals approved standard. Second Edition. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1- 56238-461-9). Wayne, PA: NCCLS.
- CLSI. (2018) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Fourth edition. CLSI supplement VET08. Wayne, PA: CLSI.
- Contreras A, Paape MJ, Miller RH. (1999) Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. *Small Ruminant Res*. 31, 203-208.
- Contreras A, Rodríguez JM. (2011) Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol*. 16, 339-356.
- Contreras A, Sierra D, Sanchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. (2007) Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Res*. 68, 145-153.
- Cuccuru C, Melonmi M, Sala E, Scaccabarozzi L, Locatelli C, Moroni P, Bronzo V. (2011) Effects of intramammary infections on somatic cell score and milk yield in Sarda sheep. *N Z Vet J*. 59, 128-131.
- Dan M, Yehui W, Qingling M, Jun Q, Xingxing Z, Shuai M, Kuojun C, Jinsheng Z, Zibing C, Zaichao Z, Xuepeng C. (2019) Antimicrobial resistance, virulence gene profile and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Xinjiang Province, northwest China. *J Glob Antimicrob Resist*. 16, 98-104.
- Diñç G, Ata Z, Temelli S. (2012) Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 59, 85-88.
- Dore S, Liciardi M, Amatisteb S, Bergagnac S, Bolzonid G, Caligiuri V, Cerronee A, Farinaf G, Montagnag CO, Saletti MA, Scatassai ML, Sotgiuj G, Cannasa EA. (2016) Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy. *Small Ruminant Res*. 141, 91-93.
- Erdoğan M. (2019). Mastitisli sütlerden *Klebsiella* spp. izolasyonu ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Erganiş O, Kuyucuoğlu Y, Ok Ü. (1995) İnek ve koyun mastitislerine sebep olan koagülaz negatif ve pozitif stafilkokların biyotiplendirilmesi. *Veterinarium*. 6, 23-27.
- EUCAST. (2019) Clinical Breakpoint Tables v. 9.0, valid from 2019-01-01.
- Fotou K, Tzora A, Voidarou Ch, Alexopoulos A, Plessas E, Avgeris I, Bezirtzoglou E, Akrida-Demertzi K, Demertzis PG. (2011) Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe*. 315-319.
- Fragkou IA, Boscoc CM, Fthenakis GC. (2014) Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Res*. 118, 86-92.
- Fthenakis GC, Arsenos G, Brozos C, Fragkou IA, Giadinis ND, Giannenas I, Mavrogianni VS, Papadopoulos E, Valasi I. (2012) Health management of ewes during pregnancy. *Anim Reprod Sci*. 130, 198-212.
- Fthenakis GC. (1998) Susceptibility to antibiotics of staphylococcal isolates from cases of ovine and bovine mastitis in Greece. *Small Ruminant Res*. 28, 9-13.

- 31- Gelasakis AI, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NGC, Fthenakis GC. (2015) Mastitis in sheep-The last 10 years and the future of research. *Vet Microbiol.* 181, 136-146.
- 32- Gökdağ MO. (2017). Mastitis izolatu Stafilokok suşlarında vankomisin dirençliliğinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- 33- Gülcü HB, Ertaş HB. (2004) Elazığ yöresinde mezbahada kesilen ineklerde mastitisli meme loblarının bakteriyolojik incelenmesi. *Türk J Vet Anim Sci.* 28, 91-94.
- 34- Gülcü HB, Öngör H. (2002) Elazığ ilinde mezbahada kesilen koyun ve keçilerde meme loblarının mastitis yönünden bakteriyolojik incelenmesi. *Vet Bil Derg.* 18, 3-4.
- 35- Hadimli HH, Erganis O, Kav K, Sayin Z. (2010) Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from samples of sheep and cattle and identification by polimerase chain reaction. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 16, 611-616.
- 36- İşnel Ceylan NB. (2009). Subklinik mastitisli keçilerde mikroorganizmaların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- 37- Jones JET, Watkins GH. (1998) Studies on mastitis in sheep at the Royal Veterinary College. *Proceedings of the Sheep Veterinary Society*, 22, 83-90.
- 38- Kern G, Traulsen I, Kemper N, Krieter J, (2013) Analysis of somatic cell counts and risk factors associated with occurrence of bacteria in ewes of different primary purposes. *Live Sci.* 157, 597-604.
- 39- Kesenkaş H. (1999). İzmir ili ve çevresinde seçilen pilot işletmelerde mastitisin belirlenmesi ve süt kalitesine etkisi üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- 40- Koltaş S. (2016). Klinik ve subklinik mastitisli keçi sütlerinden bazı aerobik bakteri ve *Mycoplasma* spp. izolasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Van YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- 41- Koop G, Rietman JF, Pieterse C. (2010) *Staphylococcus aureus* mastitis in Texel sheep associated with suckling twins. *Vet Rec.* 167, 868-869.
- 42- Kurt A. (2018). Sığır mastitis kökenli Streptokok izolatlarının bazı virüens özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- 43- Li L, Feng W, Zhang Z, Xue H, Zhao X. (2015) Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Vet Res.* 11, 168.
- 44- Lollai SA, Ziccheddu M, Di Mauro C, Manunta D, Nudda A, Leori G. (2008) Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995-2004). *Small Ruminant Res.* 74, 249-254.
- 45- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. (2012) Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18(3), 268-281.
- 46- Manser PA. (1986) Prevalence causes and laboratory diagnosis of subclinical mastitis in the goat. *Vet Rec.* 118, 552-554.
- 47- Marogna G, Rolesu S, Lollai S, Tola S, Leori G. (2010) Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Res.* 88, 119-125.
- 48- Mavrogianni VS, Cripps PJ, Fthenakis GC. (2007) Bacterial flora and risk of infection of the ovine teat duct and mammary gland throughout lactation. *Prev Vet Med.* 79, 163-173.
- 49- Mørk T, Waage S, Tollersrud S, Kvite B, Sviland S. (2007) Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Vet Scand.* 49, 23-30.
- 50- Nebbia P, Robino P, Zoppi S, De Meneghi D. (2006) Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Res.* 66, 116-120.
- 51- Obaidat MM, Salman AEB, Amira A, Roess AA. (2018) High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. *Trop Anim Health Prod.* 50, 405-412.
- 52- Olechnowicz J, Jaśkowski JM. (2014) Mastitis in small ruminants. *Med Weter.* 70(2), 67-72.
- 53- Omaleki L, Barber SR, Allen JL, Browning GF. (2010) *Mannheimia* species associated with ovine mastitis. *J Clin Microbiol.* 48, 3419-3422.
- 54- Onnasch H, Healy AM, Brophy PO, Kinsella A, Doherty ML. (2002) A study of mastitis in sheep. *Res Vet Sci.* 72, 42.
- 55- Onni T, Sanna G, Larsen J, Tola S. (2011) Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. *Vet Microbiol.* 148, 45-50.
- 56- Özdemir FÖ. (2018). Subklinik mastitisli sığırlardan major patojenlerin izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- 57- Petridis IG, Fthenakis GC. (2014) Administration of antibiotics to ewes at the beginning of the dry-period. *J Dairy Res.* 81, 9-15.
- 58- Queiroga MC. (2017) Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo region of Portugal. *Small Ruminant Res.* 153, 123-130.
- 59- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FlizPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. (2011) Veterinary microbiology and microbial disease. Second Edition. Oxford: Blackwell Science Ltd, p. 38-91.
- 60- Sabuncuoğlu N, Çoban Ö. (2006) Mastitis Ekonomisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 1(1-2), 1-5.
- 61- Saratsis P, Leontides L, Tzora A, Alexopoulos C, Fthenakis GC. (1998) Incidence risk and aetiology of mammary abnormalities in dry ewes in 10 flocks in Southern Greece. *Prev Vet Med.* 37, 173-183.
- 62- Sasshofer A, Loibl A, Kessler O. (1987) Erkankungen bei Schaf und Ziege. 7. Euterentzündungen. *Wien Tierärztl Mschr.* 4, 125-131.
- 63- Sur E. (2019). Subklinik mastitisli inek sütlerinden elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında bazı toksin genlerinin ve antibiyotik dirençliliğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- 64- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya NB. (2009) Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg.* 23 (2), 101-106.
- 65- Türkyılmaz S, Yıldız Ö, Oryaşın E, Kaynarca S, Bozdoğan B. (2010) Molecular identification of bacteria isolated from dairy herds with mastitis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 16 (6), 1025-1032.
- 66- Uçan N. (2014). Subklinik mastitisli keçilerdeki koagulaz negatif Stafilokokların saptanması ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- 67- Winter P, Schlicher F, Bago Z, Schoder D, Egerbacher M, Baumgartner W, Wagner M. (2004) Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *J Vet Med.* 51, 176-179.
- 68- Yağcı İP. (2008) Koyunlarda subklinik mastitis: etiyoloji, epidemiyoloji ve tanı yöntemleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 14(1), 117-122.
- 69- Zdragas A, Tsakos P, Kotzamanidis C, Anatoliotis K, Tsaknakis I. (2005) Outbreak of mastitis in ewes caused by *Streptococcus agalactiae*. *J Hellenic Vet Med Soc.* 56, 114-121.



Investigation of Nasal *Staphylococcus aureus* carriage in hospital employees and rapid detection of PVL and *mecA* genes by RT-PCR

Dilek Dülger¹, Seda Ekici², Özgür Albuz³, Ahu Pakdemirli⁴

¹ Karabük University Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Karabük/Turkey

² Veterinary Control Central Research Institute, Ankara/Turkey

³ Keçiören Training and Research Hospital, Department of General Surgery, Ankara/Turkey

⁴ University of Health Sciences, Gulhane School of Medicine, Department of Physiology, Ankara/Turkey

Geliş Tarihi / Received: 05.05.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 20.05.2020

Abstract: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) can cause serious fatal infections due to several enzymes and toxins that it secretes when it encounters favorable conditions. Thus, *S. aureus* is one of the most important pathogens currently causing hospital and community infections. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains are resistant to many antibiotics and have the ability to rapidly develop resistance to currently used antibiotics during treatment. MRSA origins cause serious infections with high mortality and also increase the rate of hospital infections that require difficult and longer hospitalization and the use of greater quantities of antibiotics in risk-prone units in hospitals. Another factor that is as important as MRSA in *S. aureus* pathogenicity is the Panton-Valentine leukocidin (PVL) toxin secreted by *S. aureus* strains, most commonly isolated from deadly necrotizing pneumonias and community-acquired soft skin tissue infections. PVL is especially observed in community-acquired *S. aureus* strains. However, studies showed that PVL-positive origins began to spread rapidly to hospital environments. In this study, methicillin-sensitive *S. aureus*, methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MR-CNS), and Panton-Valentine leukocidine genes were identified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) by investigating the rate of nasal *S. aureus* carriers (NSAC) in nasal swab samples collected from hospital staff belonging to the highest risk group for staphylococcal infections, at which screening is aimed. Classical NSAC scans were performed on nasal swab samples collected from 98 healthcare professionals in Hospital. Nasal *S. aureus* (4 MSSA, 13 MRSA) was detected in 17 samples (17.35%). During detection, 48 MR-CNS were detected. In addition, 61 *mecA* (+), 17 *nuc* (+), 1 *pvl* (+) genes were detected in RT-PCR samples directly from the nasal swabs collected in accordance with the culture method.

Key words: *mecA*, MRSA, *nuc*, *pvl*, *S. aureus*.

Hastane çalışanlarında Nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve PVL ile *mecA* genlerinin RT-PCR ile hızlı tespiti

Özet: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kommensal bir bakteri olarak hem insanla beraber yaşamakta, hem de fırsatçı olarak uygun koşulları bulduğunda salgıladığı bazı enzim ve toksinler nedeniyle çok ciddi ölümcül enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle günümüzde *S. aureus* hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en önemli patojenlerden biridir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) kökenleri birçok antibiyotiğe karşı dirençlidirler ve tedavi süresince kullanılan günümüz antibiyotiklerine karşı çok hızlı bir şekilde direnç geliştirme kabiliyetine sahiptirler. Bundan dolayıdır ki MRSA enfeksiyonları normal *S. aureus* enfeksiyonlarına oranla daha şiddetli ve inatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* patojenitesinde MRSA kadar önemli olan diğer bir etken, özellikle ölümcül nekrotizan pnömonilerden ve toplum kökenli deri, yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan Panton-Valentine lökositidin (PVL) toksinidir. PVL özellikle toplum kökenli *S. aureus* suşlarında gözlenmektedir. Ancak yapılan çalışmalar PVL pozitif kökenlilerin hastane ortamlarına hızla yayılmaya başladığını göstermiştir. Bu çalışmada stafilocok enfeksiyonları için en yüksek risk grubunda yer alan hastane personelinin alınan nazal swap örneklerinde nazal *S. aureus* taşıyıcılığı (NSAT) oranının araştırılması ile rt-PCR ile Metisiline Duyarlı *S. aureus*, Metisiline Dirençli Koagülaz Negatif Stafilocok ve Panton-Valentine lökositidin virülans genlerinin taramasının yapılması amaçlanmıştır. Devlet hastanesinde çalışan personelden alınan nazal swap örneklerinden klasik NSAT taraması yapılmış 98 sağlık personelinin 17'sinde (%17,35) nazal *S. aureus* taşıyıcılığı (4'ü MSSA, 13'ü MRSA) saptanırken, 48'inde MR-KNS tespit edilmiştir. Ayrıca alınan nazal swablardan direk olarak yapılan RT-PCR örneklerinde kültür metodu ile birebir uyumlu olarak 61 *mecA*(+), 17 *nuc*(+), 1 *pvl*(+) genleri tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *mecA*, MRSA, *nuc*, *pvl*, *S. aureus*.

Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a commensal pathogen that lives in close proximity to humans and causes opportunistic serious infections when it finds suitable conditions (Tong et al. 2015). *S. aureus* colonization takes place in the normal flora in many body regions, especially the skin and mucous membranes in the mammalian (Haag et al. 2019). *S. aureus* is mostly observed in the nasal mucosa and reports suggest that it is transported in the nasal mucosa in 20%–30% of the population (Lee et al. 2018). When mucosal and cutaneous barriers break down in the normal nasal mucosa, *S. aureus* can enter the bloodstream and cause serious infections in the heart, skin, soft tissues, bones and joints (Peacock and Paterson 2015). The pathogenicity of *S. aureus* varies according to the fact that Panton-Valentine leukocidin (PVL) carry a toxin and originate from methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Gordon and Lowy 2008).

MRSA resistance, which is increasingly relevant worldwide, results from a modified protein called penicillin-binding protein 2a/2 (PBP2a/PBP2') encoded by the *mecA* gene (Sardan 2000, Zhu et al. 2006). MRSA strains with the *mecA* gene are resistant to all beta-lactams and beta-lactam-derived antibiotics (Ozel et al. 2011; Keyvan and Ozdemir, 2016).

The epidemiology and characteristics of MRSA differ in different geographic regions. With the increase in resistance problems in infections caused by MRSA, MRSA has become a serious health problem causing nosocomial epidemics worldwide (Bastidas et al. 2019). The origins of MRSA are categorized as hospital-associated (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA). Compared to HA-MRSA strains, CA-MRSAs are generally sensitive to macrolides and fluoroquinolone antibiotics and are capable of producing PVL toxins (Deurenberg et al. 2004). PVL is a two-component cytotoxin that can render defense cells inactive by creating pores in immune system cells, including basophils, leukocytes, monocytes, and macrophages, in the human body (Meyer et al. 2009). The high virulence potential of CA-MRSA strains containing the PVL gene is due to the suppression of leukocytes during infection (Vandenesch et al. 2009). The PVL gene plays a critical role in the escape of *S. aureus* from the immune system and the clinical course is quite severe in the infections it causes (McDonald et al. 2005). Death is more common in CA-MRSA infections with PVL toxin, and the PVL gene is particularly observed

in CA-MRSA strains. However, studies have shown that PVL-positive strains begin to spread rapidly in hospital settings (Duman et al. 2013). Besides, it is reported that 20%–30% of hospitalized patients are colonized with the strain that is common in that hospital within the first 5–10 days (Uluğ 2012). Therefore, the rapid detection of microorganisms colonized in hospitals by molecular methods is a very important issue for both the treatment process and the implementation process of infection-control policies in the context of public health (Navarro et al. 2008). Further, although some CA-MRSA isolates contain the *mecA* gene, the methicillin minimum inhibitory concentration (MIC) values can be very low. In antibiotic susceptibility tests, these can result in mistaken identification as methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA). For this reason, it is recommended that the presence of the *mecA* gene be determined by PCR, considering that resistance cannot be detected in serious infections that do not respond to treatment (Gülay 2008). In addition, this method of determining the resistance of methicillin in MRSA strains, which are prominent with multiple resistances, is reliable, easy to apply, and gives quick results in routine laboratories. Therefore, in terms of infection-control policies, the method is very important in both treatment and application processes (Teng et al. 2009).

In this study, the *mecA* gene, which is the gold standard for determining the resistance of methicillin with both the classical culture and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), and the PVL virulence gene in MSSA and MRSA were scanned in nasal swab samples collected from health personnel working at 29 Mayıs State Hospital in Ankara.

Materials and Methods

Ethics committee approval was obtained from the Health Sciences University Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital Clinical Research Ethics Committee. With the approval of the ethics committee dated September 12, 2019 and numbered 77/18, 98 swab samples were collected from sterile swabs soaked in sterile saline from both nostrils of health personnel working in the 29 May State Hospital.

Determination of Bacteria Isolation and Methicillin Resistance

Samples were inoculated on 5% sheep-blood agar by using single streak colony reduction method. Those samples were incubated at 35°C for another

24 h, in which more than 10 colonies considered to be significant grew on the plate, and samples those grown fewer colonies were not considered.

After the colony morphology was examined, Gram staining was performed, and those strains with gram-positive cocci morphology were included in the study, and catalase, coagulase tests were performed. Those strains with positive catalase and coagulase tests were classified as *S. aureus*. The cefoxitin disk was used to determine methicillin resistance. A suspension of 0.5 McFarland turbidity was prepared from the isolates and applied to Mueller Hinton agar (Merck, Germany). Thirty micrograms of cefoxitin disks (Oxoid) were placed on the medium and incubated at 35°C for 24 h. Isolates with zone sizes ≤ 21 mm were considered to be methicillin resistant (CLSI, 2015). The cefoxitin disk-diffusion (30 µg) method, which has higher sensi-

tivity and specificity than the oxacillin disk-diffusion test, was used to determine methicillin resistance in the CNS (Swenson et al. 2007). *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 43300 were used as control strains.

In-house Real-Time Polymerase Chain Reaction

In the triplex real-time PCR study, the primers to be used for the detection of *PVL*, *mecA* (for the detection of methicillin resistance), and *nuc* (for the identification of *S. aureus*) genes were synthesized by MacroGen Inc. considering the base pairs indicated by Galia et al. (Table 1).

Nasal swabs from ATCC 25923 (MSSA) and ATCC 43300 (MRSA) were used as a negative control with reference ATCC 25922 *E. coli* strain. DNA isolation with a Bacterial DNA isolation kit (AMBRD, Turkey) according to the kit protocol was performed by Soygen Biotechnology.

Table 1. Primers and probes used in the study (Galia et al. 2019).

	GenBank® Access number	Primer/Probe	Position	Base pair	
<i>mecA</i>	KC243783.1	<i>mecA</i> fw	CAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTG	1931–1957	107
		<i>mecA</i> rev	AACCATCGTTACGGATTGCTTC	2018–2018	
		<i>mecA</i> Probe	CY5–ATGAGCTATATGAGAACGG–BHQ2	1958–1979	
<i>pvl</i>	X72700.1	<i>pvl</i> fw	AAATGCTGGACAAAACCTTCTTGG	606–624	108
		<i>pvl</i> rev	TTTGACGCTTTTGTTTTCG	693–712	
		<i>pvl</i> Probe	HEX–AAATGCCAGTGTATCC–BHQ1	636–653	
<i>nuc</i>	DQ50738	<i>nuc</i> fw	GGCATATGTATGGCAATTGTTC	25–48	73
		<i>nuc</i> rev	CGTATTGCCCTTCGAAACATT	76–97	
		<i>nuc</i> Probe	FAM–ATTACTTATAGGGATGGCTATC–BHQ1	49–71	

An optimization study was performed with ATCC 25923 (MSSA) and ATCC 43300 reference strains to determine the optimal working concentration of synthesized primers and probes. According to the results of this study, 10 µl DNA, 2.5 µl primers (900 nM) and probe (250 nM), and 10 µl master mix were arranged in 25 µl reactions. The heat cycle was adjusted as 95°C predenaturation for 5 min, 40 cycles of two steps at 95°C for 15 s for denaturation, and 60°C for 30 s for binding elongation.

Results

In the current study, the classical culture and triplex real-time PCR methods were applied to the nasal swab samples of 98 healthcare workers. The results

obtained with the culture method and triplex real-time PCR method (Table 1) were 100% compatible.

In the triplex real-time PCR results from the 98 nasal swab samples included in the study, the *nuc* gene in 17 samples, the *mecA* gene in 61 samples, and the *pvl* gene in only one sample were determined in a short time. Among the results obtained with the classical culture and triplex real-time PCR methods, 13 MRSA, 4 MSSA, 48 MR-CN and 25 MS-CNS isolates were detected, while eight of them could not be detected. These results given in Table 2. Today, although PVL strains begin to spread rapidly in hospital settings, in this study, only 1 of 98 healthcare personnel was found to have a positive PVL gene.

Table 2. Result of Triplex Real-time PCR test of 98 nasal swab samples

nuc (+)		nuc (-)	
17		81	
mecA(+) MRSA	mecA(-) MSSA	mecA(+)MR-KNS	mecA(-) MS-KNS or Stafilokok(-)
13	4	48	33

Discussion

S. aureus is one of the pathogenic microorganisms, which can be found in the mucous membranes of the skin, upper respiratory system, lower urogenital system and digestive system of animals and humans (Ozel et al. 2011; Keyvan and Özdemir, 2016). Also, *S. aureus* is one of the leading pathogens causing subclinical mastitis in dairy animals. Therefore, it causes contamination in milk and dairy products. They cause food poisoning with the different types of heat resistant enterotoxins produced. *S. aureus* is one of the most important factors of nosocomial infections. *S. aureus* quickly gains multiple antibiotic resistance, causing nosocomial and community related infections (Keyvan and Özdemir, 2016).

In terms of community health, rapid and accurate detection of hospital-borne MRSA isolates is crucial for the control of infection and the prevention of the nosocomial spread of bacteria. It has been determined that the spread of staphylococcal infections in the hospital environment occurs predominantly through the hands and clothes of the healthcare personnel. For this reason, healthcare personnel identified as nasal *S.aureus* carriers (NSAC) are an important source of transmission for MRSA (Uluğ 2012). In this study, the *mecA*, *nuc*, and PVL genes were scanned in nasal swab samples collected from health personnel working at the 29 Mayıs State Hospital using both the classical culture and triplex real-time PCR methods. While 13 MRSA, 4 MSSA, 48 methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MR-CNS), and 25 MS-CNS isolates were detected in the 98 nasal swab samples included in the study, in eight of them *Staphylococcus* spp. could not be detected. *Staphylococcus* spp. was detected in 90 (91.83%) of the 98 nasal swab samples included in the study, and the NSAC rate of healthcare professionals working at 29 Mayıs State Hospital was determined as 17.34%. Furthermore, MR-CNS was detected in 48.97% of hospital staff. It is thought that the high rate of NSAC and MR-CNS in hospital personnel is due to the collection of nasal swabs during the winter period when the rate of upper respiratory tract infections is highest.

It is known that the determination of methicillin resistance is very important for the course and treatment of *S. aureus* infections. False-negative results can cause inadequate treatment during infection as well as the spread of MRSA origin in the community and transmission even to healthy individuals without any risk factors. Treatment options are restricted in infections caused by MRSA, and mortality and morbidity increase. Furthermore, false-positive

results lead to unnecessary use of antibiotics in patients (Telli et al. 2006). Therefore, the rapid and reliable detection of MRSA, which can rapidly develop resistance to currently used antibiotics, is very important for public health. Furthermore, the method chosen for determining resistance must be able to be used in routine laboratories and to be easily applied.

Although there are multiple methods to identify and confirm methicillin resistance in *S. aureus* strains, the time required to obtain results with conventional methods varies between 2–4 days (Özen et al. 2011). Currently, thanks to technological progress, MRSA verification can be performed in 3 h using molecular methods such as PCR (Kuzucu et al. 2002; Cesur et al. 2010; Okolie et al. 2015).

In a study by Okolie et al. (2015), *nuc* and *spa* genes were detected using pentaplex PCR for the detection of *S. aureus* in clinical samples. In this study, PCR analysis was performed after pre-enrichment of the samples. Galia et al. (2019), on the other hand, determined the rate of MSSA, MRSA, and MR-KNS in conventional rectal and pharyngeal swabs using triplex real-time PCR. In the study, the authors differentiated MRSA, MSSA, and MR-KNS through the direct detection of *nuc* and *mecA* genes in a short time (3 h) using triplex real-time PCR without any enrichment of the swab samples. Furthermore, Galia et al. (2019) detected the PVL gene in their study. In the current study, both classical and molecular methods were compared and one-to-one compatibility was found between the methods. J.R.Perez et al. found that all MRSA isolates carry the PVL gene in their study. When we compared our results with the literature, we found that PVL gene positivity in *S. aureus* carriers in our hospital was very low. In our study, only one of the 13 MRSA positive cases was positive (Pérez et al. 2011).

Even though PVL gene positivity, which has an important role in bacterial virulence in our study, is very low, it is an issue to be kept in mind in common and persistent MRSA (+) hospital infections considering its role in infectiousness. Triplex real-time PCR is very important in the implementation of treatment and infection-control strategies for rapid and reliable results that can be obtained in a short time (3–4 h) for MRSA confirmations, which are of great importance for public health.

References

- 1- Bastidas CA, Villacrés-Granda I, Navarrete D, Monsalve M, Coral-Almeida M, Cifuentes SG. (2019) Antibiotic susceptibility profile and prevalence of *mecA* and *lukS-PV/lukF-PV*

- genes in *Staphylococcus aureus* isolated from nasal and pharyngeal sources of medical students in Ecuador. *Infect Drug Resist.* 12, 2553–2560.
- 2- Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Aygün Z, Karakoç E, Kinikli S, Demiröz AP. (2010) Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Mikrobiyol Bul.* 44(2), 279–284
 - 3- CLSI. (2015) CLSI–Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Sensitivity Testing. Standard M100-S25. Volume 33, Number 3. Wayne, PA
 - 4- Deurenberg RH, Vink C, Driessen C, Bes M, London N, Etienne J, Stobberingh EE. (2004) Rapid detection of Pantone–Valentine leukocidin from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 240(2), 225–228.
 - 5- Duman Y, Tekerekoğlu MS, Otlu B. (2013) Toplum ve hastane kökenli *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Pantone–Valentine lökositidin varlığının ve klonal ilişkinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 47(3), 389–400.
 - 6- Galia L, Ligozzi M, Bertoncelli A, Mazzariol A. (2019) Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus*, Pantone–Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance directly from clinical samples. *AIMS Microbiol.* 5(2), 138–146.
 - 7- Gordon RJ, Lowy FD. (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 46(5), 350–359.
 - 8- Gülay Z. (2008) Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları: Direnç ve Epidemiyoloji. *ANKEM Derg.* 22, 276–286.
 - 9- Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. (2019) *Staphylococcus aureus* in Animals. *Gram-Positive Pathogens*, 731–746.
 - 10- Keyvan E, Özdemir H. (2016) Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği. *Ank Üni Vet Fak Derg.* 63 (1), 17–23.
 - 11- Kuzucu C, Dalgalar M, Durmaz R, Dikerel S. (2002) Comparison of methods used to detect methicillin resistance in staphylococci. *Mikrobiyol Bul.* 36(3–4), 253–257.
 - 12- Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 4, 1–23.
 - 13- McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E., Mulvey MR, Levett PN, Horsman GB. (2005) Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Pantone–Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 43, 6147–6149.
 - 14- Meyer F, Girardot R, Piemont Y, Colin DA. (2009) Analysis of the specificity of Pantone–Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect Immun.* 77, 266–273.
 - 15- Navarro MB, Huttner B, Harbarth S. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in the 21st century: beyond the acute care hospital. *Curr Opin Infect Dis.* 21:372–379.
 - 16- Okolie CE, Wooldridge KG, Turner DP, Cockayne A, James R. (2015) Development of a new pentaplex real-time PCR assay for the identification of poly-microbial specimens containing *Staphylococcus aureus* and other staphylococci, with simultaneous detection so staphylococcal virulence and methicillin resistance markers. *Mol Cell Probes.* 29, 144–150.
 - 17- Ozel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Cagatay M, Sencan I, Mert A. (2011) Comparison of oxacillin, ceftoxitin, ceftizoxime, and moxalactam disc diffusion methods for detection of methicillin susceptibility in staphylococci. *Mikrobiyol Bul.* 45(2), 258–265.
 - 18- Özen NS, Dağlar D, Özhak Baysan B, Yıldırım Ç, Yazısız H, Oğunç D, Öngüt G, Çolak D, Gültekin M. (2011) Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının saptanmasında MRSA ID kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *ANKEM Derg.* 25(1):31–34.
 - 19- Peacock SJ, Paterson GK. (2015) Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem.* 84(1), 577–601.
 - 20- Pérez JR, Tapia CO, Herazo CH, Ramos NR. (2011) Nasal Carriage of Pantone–Valentine Leucocidin-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Healthy Preschool Children. *Rev Salud Publica (Bogota).* 13(5), 824–32.
 - 21- Sardan, YC. (2000) Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hast İnfek Derg.* 4, 205–217.
 - 22- Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W, Patel JB. (2007) Detection of mecA-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58, 3–39.
 - 23- Telli M, Sümerkan B, Eşel D. (2006) *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disc, oksasilin disc, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg.* 20(2), 93–96.
 - 24- Teng CS, Lo WT, Wang SR, Tseng MH, Chu ML, Wang CC. (2009) The role of antimicrobial therapy for treatment of uncomplicated skin and soft tissue infections from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 42, 324–328.
 - 25- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 28(3), 603–661.
 - 26- Uluğ M. (2012) Ameliyathane ve Yoğun Bakım Personeline Nazal *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığının Araştırılması. *Med Bull of Haseki.* 50(2), 48–52.
 - 27- Vandenesch F, Lina G, Gillet Y, Etienne J, Cremieux AC. (2009) The end of the controversy: Pantone–Valentine is the culprit. *Med Sci.* 25, 984–986.
 - 28- Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J. (2006) Evaluation of the CLSI ceftoxitin 30-microg disk diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect.* 12(10), 1039–1042.



Sığırılarda farklı pnömoni tiplerinde Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF α), Malondialdehit (MDA), Prokalsitonin ve Neopterin düzeylerinin karşılaştırılması

Nevin Tuzcu¹ , Mehmet Tuzcu² , Gökhan Akçakavak³ 

¹ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

^{2,3} Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 01.04.2020, Kabul tarihi / Accepted: 12.05.2020

Özet: Pnömoniler, sığırılarda görülen mortalite ve morbiditenin temel nedenleri arasında sayılan, önemli bir akciğer hastalığıdır. Klinik olarak iştahsızlık, yüksek ateş, solunum güçlüğü, solunum sayısında artış ve burun akıntısı ile karakterizedir. Sığırılarda solunum yolu hastalıklarının sınıflandırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, fibrinli bronkopnömoniler, irinli bronkopnömoniler, interstisyel pnömoniler ve tüberkülozis ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada kesim sonrası alınan örnekler, makroskopik bulgulara göre her grupta 25 hayvana ait olmak üzere 4 guruba (fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi) ayrıldı. Daha sonra her gruptan mikroskopik muayene ile doğrulanmış 8'er adet kan serumu ve akciğer dokusu alındı. Yapılan bu çalışmada sığırılarda tüberküloz pnömonilerinde tümör nekroz faktör alfanın (TNF α) ve neopterin, fibrinli bronkopnömonilerinde malondialdehitin (MDA), irinli bronkopnömonilerde prokalsitoninin, interstisyel pnömonilerde ise neopterin akciğer dokusunda ve kan serumunda istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlardan TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin veteriner hekimlerin pnömonileri tiplendirmesine yardımcı olabileceği düşünülse de detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Malondialdehit, Neopterin, Pnömoni, Prokalsitonin, Tümör Nekroz Faktör Alfa

Comparison of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α), Malondialdehyde (MDA), Procalcitonin and Neopterin levels in Different pneumonia types in cattle

Abstract: Pneumonia is an important lung disease that considered as one of the main causes of mortality and morbidity in cattle. It is clinically characterized by anorexia, high fever, dyspnea, increase the rate of inhaling and exhale of respiratory system and discharge of nose. Fibrinous bronchopneumonias, purulent bronchopneumonias, interstitial pneumonias and tuberculosis have been come to the fore in classification studies of respiratory diseases of cattle. In this study after slaughter samples were separated into 4 groups by based on macroscopic examination (fibrinous bronchopneumonia, purulent bronchopneumonia, interstitial pneumonia and tuberculosis pneumonia) each group consists of 25 cattle. Later, 8 blood serums and lung tissues were taken from each group were confirmed by microscopic examination. In this study, the tumor necrosis factor alpha (TNF α) and neopterin of tuberculosis pneumonias, malondialdehyde (MDA) of fibrinous bronchopneumonias, procalcitonin of pulmonary bronchopneumonias, and neopterin of interstitial pneumonias were statistically found to be significantly higher in both of lung tissues and sera of cattle. It was thought that, although TNF α , MDA, procalcitonin and neopterin can help veterinarians to type pneumonia, comprehensive studies are needed.

Key words: Malondialdehit, Neopterin, Pneumonia, Procalcitonin, Tumor necrosis factor alpha

Giriş

Pnömoniler klinik olarak iştahsızlık, yüksek ateş, solunum güçlüğü, solunum sayısında artış ve burun akıntısı ile karakterizedir (Lopez ve ark. 2017). Pnömonide oluşan lezyonlar, etkenin türüne, akciğere giriş yoluna, hayvanın yaşına ve direncine göre değişiklik gösterir. Sığırılarda solunum yolu hastalıklarının sınıflandırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, fibrinli bronkopnömoniler, irinli bronkopnömoniler, interstisyel pnömoniler ve tüberkülozis ön plana çıkmaktadır (Caswel ve ark. 2007; McGavin ve ark. 2007; Çiftçi ve ark. 2015).

Sığırılarda en sık görülen pnömoni tipi olan bronkopnömoniler fırsatçı bakteriler ve mikoplazmalar tarafından oluşturulur. Oluşan lezyonlar genellikle akciğerlerin kranio ventral bölgelerinde yer alan düzensiz konsolide alanlar şeklindedir (Çiftçi ve ark. 2015).

Bronkopnömoninin erken dönemlerinde hiperemi ile birlikte bronşioalveoler boşluklarda ödem dikkati çeker. Akciğerde hasar arttıkça nötrofil granülosit, alveoler makrofaj infiltrasyonu ile fibrin oluşumu görülür (Lopez ve ark. 2017). Bronkopnömoniler; eksudat içerisinde nötrofil lökosit yoğun-

luktaysa irinli bronkopnömoni, fibrin fazla ise fibrinli bronkopnömoni olarak isimlendirilir (Dungworth 1993; Milli ve ark. 2001).

Fibrinli bronkopnömonide plevra da yangıya katıldığı için plöropnömoni olarak da isimlendirilir (Caswel ve ark. 2007; McGavin ve ark. 2007; Çiftçi ve ark. 2015). Şiddetli konjesyon, hemoraji ve yoğun fibrin birikimi ile karakterize olan fibrinli bronkopnömonilerde kırmızı, kahverengimsi veya gri renkli hepatize alanlar görülür (Ortatatlı 1997; Caswel ve ark. 2007; Çiftçi ve ark. 2015). Fibrinli bronkopnömonilerin mikroskopisinde genel olarak bronşiyol ve alveol lümenlerinde plazma proteinince zengin sıvı, fibrin, nötrofil lökositler ile dökülmüş nekrotik hücreler göze çarpar (Lopez ve ark. 2017).

İnterstisyel pnömonide akciğer süngerimsi kıvamda, kesit yüzü kuru görünümündedir. Çoğunlukla üzerinde kaburga izleri bulunan akciğer loblarında kollaps, hepatizasyon veya konsolidasyon gözlenmez (Dungworth 1993; Çiftçi ve ark. 2015). Mikroskopik olarak alveol bazal membran ve bronşiyol duvarında hiyalin membranları görülür. Artan nötrofil granülosit ve ödem sıvısı alveol duvarının kalınlaşmasına neden olur (Lopez ve ark. 2017). Bronşiyol, bronş ve damarlar etrafındaki lenfoid dokularda hiperplazi meydana gelir. (Caswel ve ark. 2007; McGavin ve ark. 2007; Radelli ve ark. 2008; Yılmaz 2009).

Granülomatöz pnömoniler, farklı büyüklüklerde ve sayıda akciğere rastgele yayılmış, granülom oluşumu ile karakterize kronik pnömonilerdir (Jones ve ark. 1983; Ortatatlı ve ark. 1998; Akıllı ve ark. 2012). Sığırlarda granülomatöz pnömonilerin en önemlisi tüberküloz pnömonisidir (Milli ve ark. 2001; Caswel ve ark. 2007; McGavin ve ark. 2007).

Makrofajlar tarafından ortama salınan TNF α immun sistem hücrelerini aktive etmektedir. TNF α makrofajlardaki tetiklenebilir nitrik oksit sentetazı uyarır ve nitrik oksit yapımını artırır, böylece makrofajların antibakteriyel etkinliğini artırır (Demirtaş ve ark. 2012). TNF α makrofajların apoptozuna yol açarak tüberküloz etkenlerinin ortama yayılmadan yok edilmesine yardımcı olur. TNF α çok sayıda sitokin ve kemokinin salınımını artırarak inflamasyon bölgesine lenfositlerin göçüne ve proliferasyonuna neden olur. Bu sayede granülom formasyonu oluşur ve basiller yok edilmese de bu yapı içerisinde hapsedilerek çoğalmaları ve yayılmaları önlenir (Keane ve ark. 2001). Tüberkülozda granülom, lenfositlerin makrofajları uyararak hücre içerisindeki etkeni yok edebilmesi için uygun ortam sağlar. İnfeksiyonun kontrolü için granülomun oluşumu ve devamının sağlanması esastır. Granülomların devam edebilmesi

de TNF α 'ya bağlıdır (Stenger ve ark. 2002; Çağlayan ve ark. 2012; Demirtaş ve ark. 2012).

Serbest radikallerin doku seviyeleri inflamasyonun gelişimi sırasında önemli artış gösterir. Membranların yapısında yer alan doymamış fosfolipitler ve kolesterol ile serbest radikaller kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Bu sürecin gelişimi sırasında şekillenen bir dizi reaksiyon sonucu enfeksiyonların tanısında kullanılan ve membran hasarını gösteren önemli biyolojik markerlerden MDA ortaya çıkar. MDA miktarının ölçümü ile indirek olarak lipid peroksidasyonunun derecesi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Özkan ve ark. 2003; Tüközkan ve ark. 2006).

Prokalsitonin, tiroid C hücrelerinde üretilen ve kalsiyum homeostasisinde görevli kalsitonin hormonun prekürsörüdür (Assicot ve ark. 1993). Tiroid bezindeki nöroendokrin hücrelerden ayrı olarak sepsis durumlarında akciğer ve barsak gibi organlardan da salınan prokalsitonin sağlıklı bireylerde düşük seviyelerde bulunur (Baylan ve ark. 2002; Ertuğrul ve ark. 2005). Farklı yaş ve cins sığırlarda yapılan bir çalışmada ergin erkek sığırlarda kan prokalsitonin seviyesinin ortalama 53,349 pg/ml olduğu bildirilmiştir (Ercan ve ark. 2014).

Aktive monosit/makrofajlar tarafından üretilen ve düşük molekül ağırlıklı 2-amino-4-hidroksi-(1'2'3' trihidroksipropil)-pteridin yapısında olan neopterin, hücre aracılı immunitenin bir belirteci olarak kabul edilir. IFN- γ potansiyel neopterin üreticisidir ve neopterin konsantrasyonları vücut sıvılarından IFN- γ varlığını gösterir (Cesur 2005). Neopterin hücre aracılı immunitenin sensitif biyobelirtecidir (Stang ark. 1998; Cesur 2005; Ercan ve ark. 2014).

Beşeri hekimlikte inflamasyonun izlenmesinde rutin olarak kullanılmakta olan biyobelirteçler, son yıllarda veteriner hekimlik alanında da kullanılmaya başlanmıştır (Hisaeda ve ark. 2001; Başoğlu ve ark. 2004; Ergönül ve ark. 2009; Özçelik ve ark. 2014). Ancak veteriner hekimlik alanında pnömonilerin tiplendirilmesi ve bu hastaların tedaviye verdiği yanıtların izlenmesinde rutin olarak kullanılacak biyolojik markerlere ait bilgiler sınırlıdır.

Bu çalışmada enfeksiyon hastalıklarının belirlenmesinde ve prognozun değerlendirilmesinde önemli faydalar sağladığı bilinen biyolojik markerlere yönelik veteriner hekimliği alanında yapılacak çalışmalara ışık tutulması amacıyla; TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin gibi biyobelirteçlerin sığırların fibrinli ve irinli bronkopnömonilerinde, interstisyel pnömonilerinde ve tüberküloz pnömonisinde akciğer doku-

sunda ve kan serumlarındaki düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini mezbahaya kesim için getirilen 3270 adet 20-24 aylık sığırlardan kesim öncesi muayenede pnömoni semptomları belirlenen 296 adet sığıra ait akciğer içerisinde kesim sonrası makroskopik özelliklerine göre fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olabileceği düşünülen 25'er adet pnömonili akciğer dokusu oluşturmuştur.

Pnömoni semptomu belirlenen hayvanların tamamından kesim öncesi kan örnekleri alındı. Makroskopik olarak pnömoni belirlenen akciğerlerden alınan örneklerin bir kısmı ve kan serumları -20°C'de saklandı. Akciğerlerin diğer kısımları histopatolojik olarak incelendi. Histopatolojik olarak fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz olarak belirlenenlerle birlikte kontrol gurubundaki sağlıklı sığırlara ait -20°C'de saklanan 8'er adet akciğer doku ve aynı hayvanlara ait kan serum örnekleri ELISA yönteminde kullanıldı.

Akciğer örneklerinin, kendi gurupları içerisinde benzer şiddette lezyon bulunduran olgulardan alınmasına dikkat edildi.

Histopatolojik incelemeler için alınan akciğer örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular bilinen yöntemlere göre takip edilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan seri kesitler hematomaksilen eozin (HE) ve Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenerek pnömoni tipleri belirlendi.

Akciğer örneklerinden ve kan serumlarından prokalsitonin seviyeleri sandwich enzim immunoassay, TNF-α, MDA, Neopterin seviyeleri kompetitif inhibisyon enzim immunoassay yöntemi ile ticari kitler (Cusabio, PRC) kullanılarak kit prosedürlerine uygun şekilde ELISA cihazı (Thermo Multiskan) kullanılarak belirlendi.

Elde edilen verilerin istatistik analizinde Student-T Testi ve ANOVA testlerinden yararlanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar SPSS 14.00 paket programı ile gerçekleştirildi (SPSS Inc., Chicago).

Bulgular

Fibrinli bronkopnömoni olarak tiplendirilen akciğerlerin interlobüler septumlarının belirginleştiği ve alacalı mermer görünümünde olduğu tespit edildi.

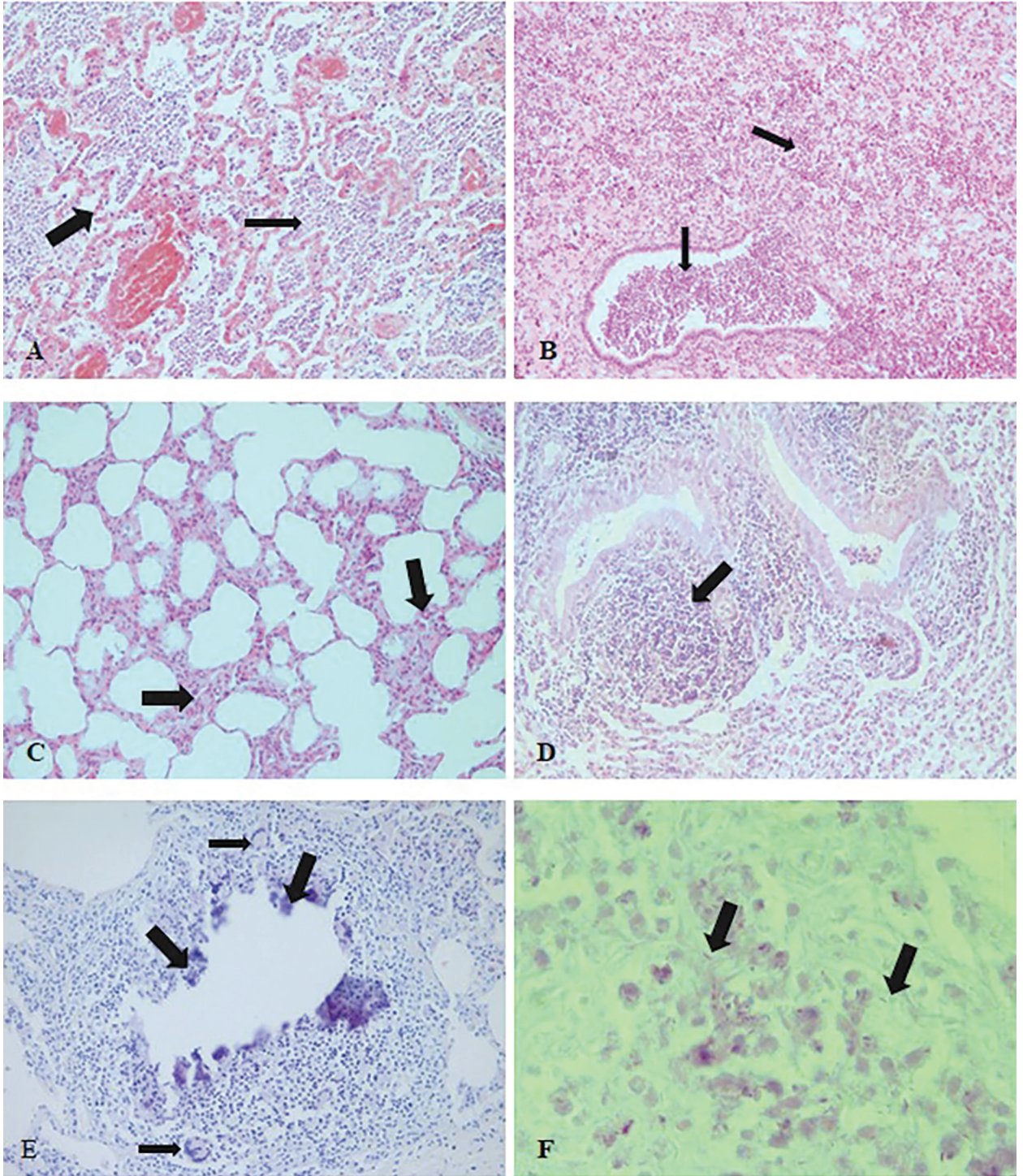
Mikroskopik olarak interalveoler kapillarların hiperemik olduğu alveol lümenlerinde ödem sıvısı bulunduğu ve interlobüler septumların fibrin ve ödem nedeniyle kalınlaştığı gözlemlendi. Bazı alanlarda alveol lümenindeki ödemin yerini fibrince zengin bir eksudatın aldığı ve eksudat içerisinde nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerinin bulunduğu tespit edildi (Şekil 1A). Plevrada fibrin ve ödem nedeniyle kalınlaşma dikkati çekti.

Irinli bronkopnömoni olarak tiplendirilen akciğerlerde keskin sınırlı, sert kıvamlı gri kırmızı renkli farklı büyüklükte alanlar tespit edildi. Bu alanların kesit yüzlerinde irin bulunmaktaydı. Mikroskopik olarak alveol, bronşiyol ve bronş lümenlerinin yoğun nötrofil lökositler ile dolu olduğu ve bazı epitel hücrelerinin döküldüğü dikkati çekti (Şekil 1B).

İnterstisyel pnömoni olarak değerlendirilen olgularda akciğer loblarında hacim artışı belirlendi. Kesit yüzünde, bronşiyol lümenlerinde az miktarda berrak bir sıvı bulunduğu gözlemlendi. Akciğerlerin kolabe olmadığı dikkati çekti. Mikroskopik olarak interalveoler septumların kalınlaşmış olduğu (Şekil 1C), bronşiyol lümenlerinin nötrofil lökosit ve dökülmüş epitel hücreleri ile dolu olduğu dikkat çekti. Bronşiolitis obliterans ve lenfoid hiperplazi tespit edildi (Şekil 1D). Bazı alveollerde hiyalin membranlara rastlandı.

Tüberküloz olarak değerlendirilen olgularda belirlenen tüberkülomların 3-4 mm çapında granülom şeklinde olduğu, bazı olgularda ise granülomların birleşerek tüberküllerin büyüklüğünün 1-3 cm çapa ulaştığı dikkati çekti. Kapsülle çevrili olan bu tüberküller kesildiğinde, ortada nekroz alanı ile gri veya beyaz renkli kalsifikasyonu düşündürülen sert bir kitlenin bulunduğu belirlendi. Mikroskopik olarak ortada kazeifikasyon nekrozu ve kalsifikasyon alanı, çevresinde makrofaj, epitelooid hücre, langhans tipi dev hücresi (Şekil 1E), lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre kuşağı ile en dışta fibröz bağ dokunun oluşturduğu kapsül ile karakterize olduğu görüldü. Ziehl-Neelsen yöntemi ile yapılan boyamalarda nekroz alanının çevresinde serbest veya langhans tipi dev hücresinin sitoplazmasında kırmızı renkli tüberküloz etkenleri gözlemlendi (Şekil 1F).

Çalışmada patolojik olarak fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ve kontrol grubu akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait kan serumlarında ölçülen TNFα, MDA, prokalsitonin ve neopterin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 1. A. Fibrinli bronkopnömoni, interalveoler septumda hiperemi (kalın ok), alveol lümenlerinde ödem ve nötrofil lökositler (ince ok), H.E, $\times 200$ **B.** İrinli bronkopnömoni, bronşiyol ve alveol lümenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu ve dökülmüş epitel hücreleri (oklar), H.E, $\times 200$. **C.** İnteristiyel pnömoni, interalveoler septumda mononükleer hücre infiltrasyonları ve bağ doku artışı (ok), H.E, $\times 200$. **D.** İnteristiyel pnömoni, bronşiyolitisi obliterans, (ok) H.E, $\times 200$. **E.** Tüberküloz pnömonisi, kazeifikasyon nekrozu ve kalsifikasyon (kalın oklar), langhans tipi dev hücresi (ince ok) H.E, $\times 200$. **F.** Kazeifikasyon alanındaki aside dirençli bakteriler (oklar), Z.N, $\times 1000$

Çalışmada patolojik olarak fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ve

kontrol grubu akciğer örneklerinde ölçülen TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. Fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ve kontrol grubu akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait kan serumlarında ölçülen TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin ortalamaları ve standart sapmaları.

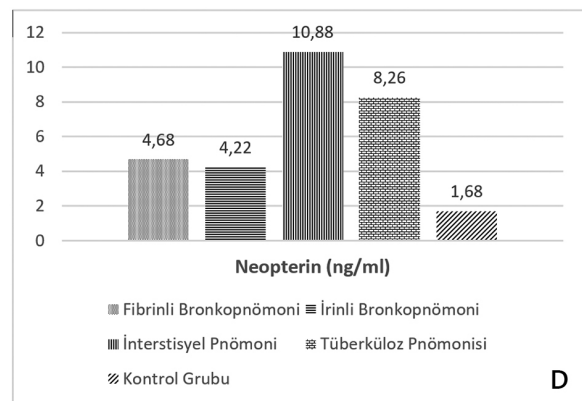
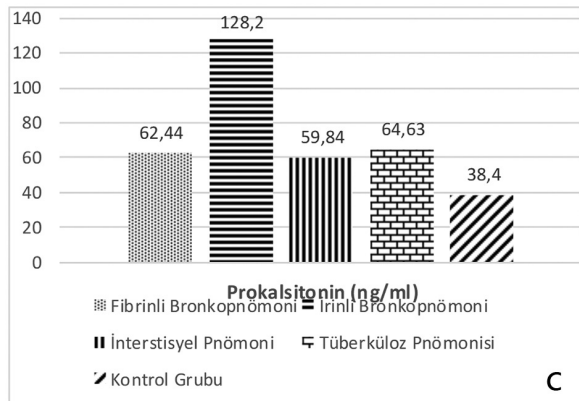
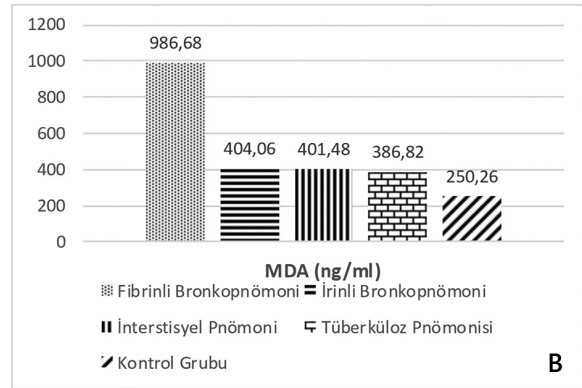
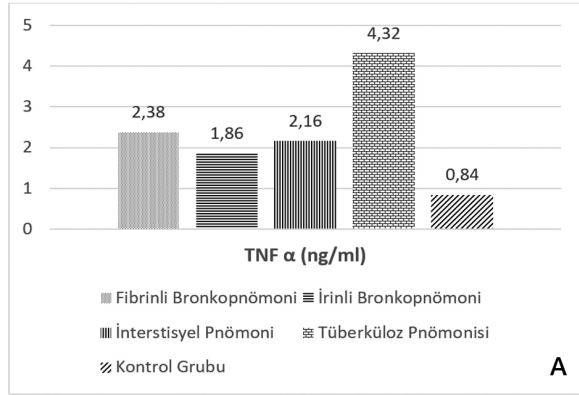
Biyolojik Marker (pg/ml)	Fibrinli Bronkopnömoni (n=8)	İrinli Bronkopnömoni (n=8)	İnterstisyel Pnömoni (n=8)	Tüberkülozis (n=8)	Kontrol (n=8)
TNF α	2,38±1,44c	1,86±0,46d	2,16±1,23c	4,32±0,42b	0,84±0,16a
MDA	986,68±48,14c	404,06±24,83b	401,48±42,62b	386,82±54,22b	250,26±54,20a
Prokalsitonin	62,44±4,32b	128,20±7,82c	59,84±4,56b	64,63±7,62b	38,40±5,62a
Neopterin	4,68±0,14c	4,22±0,12c	10,88±0,36b	8,26±0,40b	1,68±0,38a

a, b, c : Aynı satırda farklı harf olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0.05).

Tablo 2. Fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ve kontrol grubu akciğer örneklerinde ölçülen TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin ortalamaları ve standart sapmaları.

Biyolojik Marker (pg/ml)	Fibrinli Bronkopnömoni (n=8)	İrinli Bronkopnömoni (n=8)	İnterstisyel Pnömoni (n=8)	Tüberkülozis (n=8)	Kontrol (n=8)
TNF α	2,62±1,67c	1,96±0,11d	2,43±1,40c	4,68±0,06b	0,76±0,09a
MDA	1108,27±68,12c	522,06±38,24b	501,82±48,71b	480,94±65,42b	420,64±35,32a
Prokalsitonin	70,34±6,13b	318,00±8,74c	66,76±3,16b	68,23±8,80b	42,40±6,26a
Neopterin	4,96±0,12c	4,82±0,09c	10,56±0,40b	8,34±0,51b	2,10±0,58a

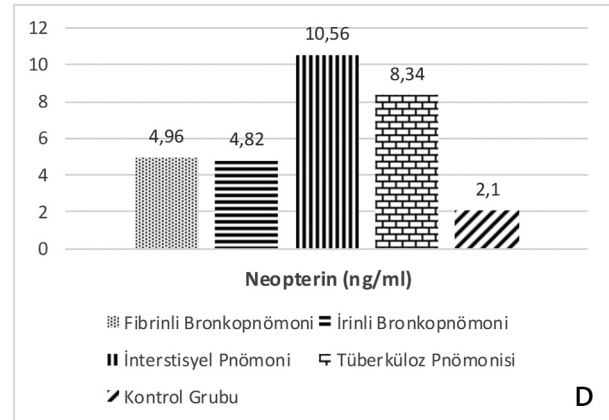
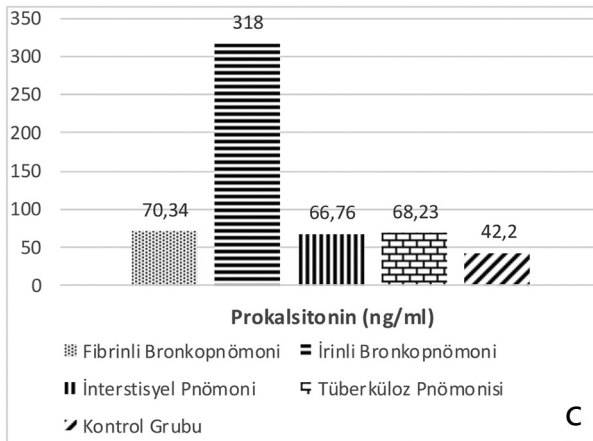
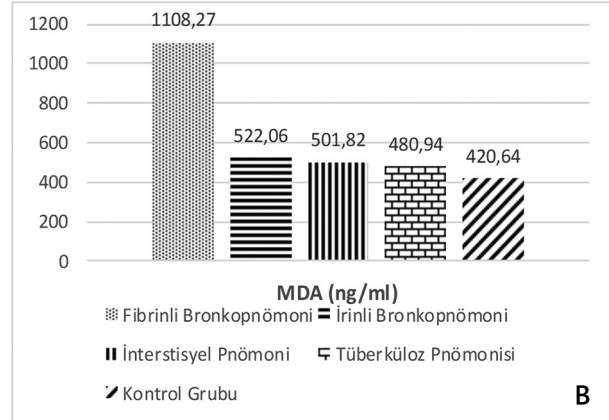
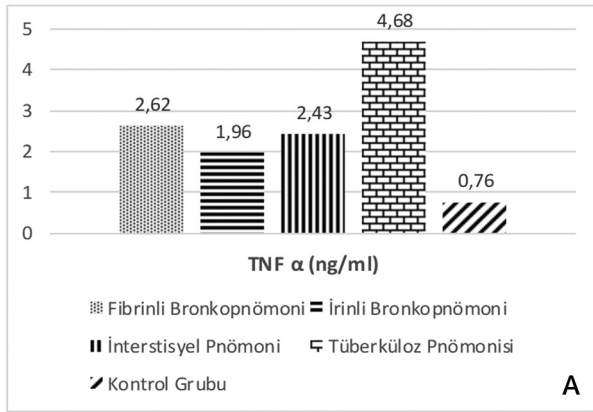
a, b, c : Aynı satırda farklı harf olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0.05).



Grafik 1. Fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ve kontrol grubu akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait kan serumlarında ölçülen TNF α (A), MDA (B), prokalsitonin (C) ve neopterin (D) seviyeleri.

Pnömoni tiplerine göre kan serumlarında, tüberküloz pnömonili sığırlarda TNF α 'nın (Grafik 1A) ve neopterin (Grafik 1D), fibrinli brokopnömonilerde MDA'nın, (Grafik 1B) irinli bronkopnömonilerde prokalsitoninin (Grafik 1C), interstisyel pnömonilerde ise neopterin akciğer dokusunda ve kan serumunda istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (P<0.05).

Pnömoni tiplerine göre akciğer örneklerinde, tüberküloz pnömonili sığırlarda TNF α 'nın (Grafik 2A) ve neopterin (Grafik 2D), fibrinli brokopnömonilerde MDA'nın, (Grafik 2B) irinli bronkopnömonilerde prokalsitoninin (Grafik 2C), interstisyel pnömonilerde ise neopterin akciğer dokusunda ve kan serumunda istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (P<0.05).



Grafik 2. Fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ve kontrol grubu akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait akciğer örneklerinde ölçülen TNF α (A), MDA (B), prokalsitonin (C) ve neopterin (D) seviyeleri.

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde yapılan çalışmalarda besi sığırlarında görülen ölümlerin %50-70'nin solunum sistemi hastalıklarından kaynaklandığı bildirilmektedir (Alkan ve ark. 1997; Çimtay ve ark. 2000, Çiftçi ve ark. 2015). Bu makalede, sığırlarda görülen pnömoni tipleri ile pnömonili sığırlara ait akciğer dokuları ve kan serumlarındaki TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin düzeyleri arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Çalışmada fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen akciğerlerde belirlenen makroskobik ve mikroskobik bulgular pnömonilerin tiplendirildiği çok sayıda çalışmanın ve veteriner patoloji alanındaki temel kaynakların bildirdiği bulgularla benzerdir. (Gourlay ve ark. 1970; Dalgleish 1991; Dongworth 1993; Ortatatlı 1997; Milli ve ark. 2001; Caswell ve ark. 2007; McGavin ve ark. 2007; Çiftçi ve ark. 2015).

TNF α reseptör kompleksi, hedef hücrede birçok biyolojik aktivitenin başlamasına neden olur. TNF α , proinflamatuvar sitokin olarak aktive T hücrelerinden ve makrofajlardan salınır (Demirtaş ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmada fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberkülozis olarak tiplendirilen ayrıca kontrol grubu olarak değerlendirilen akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait kan serumlarında ölçülen TNF α , seviyelerinin ortalamaları sırasıyla 2,38 ng/ml, 1,86 ng/ml, 2,16 ng/ml, 4,32 ng/ml ve 0,84 ng/ml olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda 0,84 ng/ml olarak belirlenen TNF α ortalaması Ercan ve ark.'ın (2014) sağlıklı sığırlarda belirledikleri seviyelerle benzerdir. Pnömoni gruplarında belirlenen TNF α ortalamaları kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş ve bu fark istatistiki olarak anlamlı çıkmıştır ($P < 0.05$). Pnömoni grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında fibrinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni gruplarında belirlenen TNF α seviyesi irinli bronkopnömoni grubuna kıyasla yüksek tüberküloz gruplarında ise belirlenen TNF α seviyesinin diğer gruplara kıyasla oldukça yüksek olduğu dikkat çekmiştir ($P < 0.05$). Yine bu çalışmada fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz olarak tiplendirilen ayrıca kontrol grubu olarak değerlendirilen akciğer örneklerinde ölçülen TNF α seviyelerinin ortalamaları sırasıyla 2,62 ng/ml, 1,96 ng/ml, 2,43 ng/ml, 4,68 ng/ml ve 0,76 ng/ml olarak hesaplanmıştır. Bu değerler klinik olarak pnömoni belirtisi gösteren sığırların kan serumunda belirlenecek TNF α seviyelerinin pnömonili akciğer dokularındaki düzeylerine işaret edebileceği, fakat fibrinli bronkopnömoni ve interstisyel pnömoni ayrımı için yeterli olamayacağı ancak tüberkülozisin teşhisinde klinik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde önemli bir ipucu sağlayabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

TNF α inflamasyonda doku cevabı olarak ilk salınan immun mediatörlerdendir. TNF α 'nın serumdaki seviyelerinin mastitis prognozunu ortaya koymada kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada mastitisli sığırlarda serum TNF α seviyelerinin yüksek olduğu, yine süt serumlarının TNF α seviyesinin istatistiki olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu rapor edilmiştir (Hiseade ve ark. 2001). Bu çalışmada belirlenen bulgulara benzer şekilde yapılan bu çalışmada da pnömoni gruplarının tamamında kontrol grubuna kıyasla TNF α seviyesinin yüksek ölçülmüş olması TNF α 'nın sığırlarda inflamasyonu gösteren bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Oksidatif stresin varlığı ve derecesi, lipid peroksidasyonu olarak bilinen süreçte son ürün olarak şe-

killenen MDA miktarının belirlenmesiyle ortaya konabilmektedir ve artan MDA miktarı oksidatif stresin en önemli biyobelirteçlerindedir (Ünlü ve ark. 1999; Özkan ve ark. 2003; Özçelik ve ark. 2014). MDA kan plazmasında serbest oksijen radikallerini azalttığına bir göstergesi olarak yorumlanmaktadır (Özyurt ve ark. 2006). Akciğerler serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemek ve kompanze etmek için güçlü bir antioksidan mekanizmaya sahiptir (Ünlü ve ark. 1999; Özkan ve ark. 2003). Kronik obstruktif pulmoner hastalıklı bireylerde lipid peroksidasyonun yan ürünü olan 1-hidroksinonenol ile MDA miktarındaki değişimleri belirlemek üzere yapılan bir çalışmada 1- hidroksinonenol ile MDA miktarındaki artışın akciğer fonksiyonu ile negatif ilişkili olduğu rapor edilmiştir. (Rahman ve ark. 2002). Yapılan bu çalışmada patolojik olarak fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait kan serumlarında ölçülen MDA seviyelerinin ortalamaları sırasıyla 986,68 ng/ml, 404,06 ng/ml, 401,48 ng/ml ve 386,82 ng/ml, kontrol grubunda ise 250,26 ng/ml olarak belirlenmiştir. Yine bu çalışmada fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz olarak tiplendirilen ayrıca kontrol grubu olarak değerlendirilen akciğer örneklerinde ölçülen MDA seviyelerinin ortalamaları sırasıyla 1108,27 ng/ml, 522,06 ng/ml, 501,82 ng/ml, 480,94 ng/ml ve 420,64 ng/ml olarak bulunmuştur. Pnömoni gruplarında ölçülen yüksek MDA seviyesi literatür ile uyumludur.

Ercan ve ark.'nın (2014) yaptıkları çalışmalarında yeni doğan, genç ve ergin sığırlarda ortalama serum MDA seviyelerini sırayla 267,4 ng/ml, 454,3 ng/ml ve 473 ng/ml olarak rapor etmişlerdir. Ercan ve ark.'nın (2014) farklı yaş ve cinsiyetteki sığırlarda belirlediği serum MDA seviyeleri yapılan bu çalışmada fibrinli pnömoni grubu dışında kalan çalışma gruplarında ölçülen değerle benzerlik göstermektedir. Ancak kontrol grubunda ölçülen değerler Ercan ve ark.'nın (2014) bildirdiği değerlerden düşüktür. Bu çalışmada kontrol grubunda ölçülen MDA seviyesi pnömoni grupların tamamından düşüktür ($P < 0.05$). Yine fibrinli bronkopnömoni grubunda belirlenen MDA değerleri de istatistiki olarak diğer pnömoni gruplarından yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Elde edilen bulgular klinik pnömonili sığırlar ile sağlıklı sığırların kan MDA düzeylerini karşılaştıran Özçelik ve ark (2014)'nın çalışmalarında belirttikleri klinik pnömonili sığırlarda serum MDA düzeyleri sağlıklı sığırlardan istatistiki olarak yüksektir bulgusuyla örtüşmektedir. Özçelik ve ark (2014)'nın bulgularına benzer şekilde yapılan bu çalışmada da pnömo-

ni gruplarının tamamında kontrol grubuna kıyasla MDA seviyesinin yüksek ölçülmüş olması serum MDA değerlerinin sığırlarda inflamasyonu gösteren bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.

Prokalsitoninin beşeri hekimlikte yeni doğan ünitelerinde, pnömoni, septisemi, menenjit, mantar ve parazit enfeksiyonlarında inflamasyonu izlemede ve prognozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. (Assicot ve ark. 1993; Demirdağ ve ark. 2003; Ertuğrul ve ark. 2005). Yapılan bu çalışmada fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni interstisyel pnömoni ve tüberküloz pnömonisi olarak tiplendirilen ayrıca kontrol grubu olarak değerlendirilen sığırlara ait kan serumlarında prokalsitonin seviyelerinin ortalaması sırasıyla 62,44 pg/ml, 128,20 pg/ml, 59,84 pg/ml, 64,63 pg/ml ve 38,40 pg/ml olarak akciğer dokularında ise 70,34 pg/ml, 318,00 pg/ml, 66,76 pg/ml, 68,23 pg/ml ve 42,40 pg/ml olarak belirlenmiştir. Pnömoni gruplarında serum ve akciğer dokularında ölçülen prokalsitonin seviyesi kontrol grubundan istatistik olarak yüksektir ($P<0.05$). İrinli pnömoni grubunda belirlenen prokalsitonin seviyeleri ise diğer pnömoni gruplarından anlamlı şekilde daha yüksektir ($P<0.05$). Bu sonuçlar beşeri hekimlik alanında yapılan çalışmalarda elde edilen prokalsitonin seviyesinin yüksekliği ile inflamasyon arasında bir ilişkinin bulunduğu yönündeki kanaatle uyumlu bulunmuştur (Baylan ve ark. 2002; Demirdağ ve ark. 2003; Ertuğrul ve ark. 2005). Kandemir ve ark'nın (2003) ve Baylan ve ark'nın (2006) aktif pulmoner tüberkülozlu hastalarda serum prokalsitonin seviyelerinin artacağı, ancak prokalsitoninin spesifik olmakla birlikte zayıf sensitif bir marker olması, prokalsitonin ölçümünün duyarlılığının düşük olması nedeniyle aktif pulmoner tüberküloz tanısı için güvenilir bir test olmadığı yönündeki kanaatleri çalışmamızın bulguları ile uyumludur.

Neopterin, monosit ve makrofajların, özellikle γ -interferon tarafından uyarılması sonucu salınan pteridin yapısında bir bileşiktir. Son yıllarda çeşitli viral, bakteriyel, inflamatuvar ve malign hastalıklar gibi birçok hastalıkta neopterin düzeylerinin yüksek bulunması neopterin olan ilgiyi artırmıştır. (Fuchs ve ark. 1984; Huber ve ark. 1984; Basbug ve ark. 2016; Basbug ve ark. 2020) Neopterin hücre aracılı immün yanıtın biyokimyasal belirteci olarak kabul edilmektedir (Huber ve ark. 1984; Watcher ve ark. 1989; Cesur 2005). Tüberküloz enfeksiyonu hücreli immün yanıt ile kontrol edilebilen hücre içi enfeksiyonların tipik bir örneğidir (Cesur 2005; Yüksekol ve ark. 2003). Yapılan pek çok çalışmada, reaktif oksijen metabolitleriyle etkileşimin ve oksidatif stresin yük-

selmesinin neopterinle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yüksekol ve ark. 2003; Mohammed ve ark. 2001; Tozkoparan ve ark. 2005). Yapılan bu çalışmada fibrinli bronkopnömoni, irinli bronkopnömoni, interstisyel pnömoni ve tüberküloz olarak tiplendirilen ayrıca kontrol grubu olarak değerlendirilen akciğer örneklerinin alındığı sığırlara ait kan serumlarında ölçülen neopterin seviyelerinin ortalamaları sırasıyla 4,68 ng/ml, 4,22 ng/ml, 10,88 ng/ml, 8,26 ng/ml ve 1,68 ng/ml olarak hesaplanmıştır. Yine kan serumlarında ölçülen neopterin seviyelerine paralel olacak şekilde akciğer dokularında da sırayla 4,96 ng/ml, 4,82 ng/ml, 10,56 ng/ml, 8,34 ng/ml ve 2,10 ng/ml neopterin seviyeleri ölçülmüştür.

Yapılan bu çalışmada kontrol grubunda ölçülen neopterin seviyesi istatistik olarak tüm pnömoni gruplarından düşüktür ($P<0.05$). Pnömoni grupları karşılaştırıldığında tüberküloz grubu ile interstisyel pnömoni grubunun, fibrinli pnömoni grubu ile irinli bronkopnömoni grubunun benzer olduğu, interstisyel pnömoni grubu ve tüberküloz grubunda ölçülen neopterin değerlerinin oldukça yüksek olduğu belirlendi ($P<0.05$).

Tüberkülozlu hastalarda yapılan çok sayıda çalışmada neopterin seviyesinin serum ve plevral sıvıda yüksek ölçüldüğüne dair çok sayıda rapor vardır (Mohammed ve ark. 2001; Yüksekol ve ark. 2003; Cesur 2005; Tozkoparan ve ark. 2005). Bu çalışmada da tüberküloz grubunda hem akciğerde ve hem de kan serumlarında neopterin seviyesinin yüksek ölçülmüş olması literatür bilgileriyle uyumludur. Yine interstisyel pnömoni grubunda neopterin seviyesinin kontrol grubuna kıyasla yüksek ölçülmesi, sığırlarda interstisyel pnömonilerin etiolojisinde çoğunlukla viral etkenlerin rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda, neopterin seviyesinin viral enfeksiyonlarda yükseldiğini rapor eden literatür ile örtüşmektedir (Cesur 2005).

Çalışmada pnömoni akciğer dokularında ölçülen TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin seviyeleri ile aynı gruplara ait kan serumlarında ölçülen TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin seviyelerinin paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, klinik olarak pnömoni belirtisi gösteren sığırlarda kan serumlarından ölçülecek TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin seviyelerinin akciğer dokularındaki düzeylerine işaret edebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada sığırların tüberküloz pnömonilerinde TNF α ve neopterin, fibrinli bronkopnömonilerinde MDA'nın, irinli bronkopnömonilerde prokalsitoninin, interstisyel pnömonilerde ise neopterin akciğer dokusunda ve kan se-

rumunda istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Elde edilen sonuçlardan TNF α , MDA, prokalsitonin ve neopterin veteriner hekimlerin pnömonileri tiplendirmesine yardımcı olabileceği düşünülse de biyobelirteçlerin beşeri hekimlikte olduğu gibi veteriner hekimliği alanında yoğun olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Deney hayvanı kullanılmadığı için Etik Kurul Kararı alınmamıştır.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

- Akıllı H, Yoldaş A, Özmen M, Topçuoğlu H, Turut N, Tuzcu N. (2012). Çukurova Yöresinde sığırlarda görülen granülatöz pnömonilerin etiyolojisinin histopatolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. *AVKAE Derg.* 2, 1-6.
- Alkan F, Özkul A, Karaoğlu MT, Bilde S, Akça Y, Burgu İ, Yeşilbaş K, Oğuzoğlu TÇ. (1997). Sığırlarda viral nedenli solunum sistemi enfeksiyonlarının seroepidemiolojisi. *AÜ Vet Fak Derg.* 44, 1-8.
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohun C. (1993). High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* 341 (8844), 515-518.
- Basbug O, Agaoglu ZT, Tuzcu N, Coskun A, Aydogdu U, Yığın A. (2016). Tumour necrosis factor-alpha, haptoglobin, serum amyloid A and neopterin levels in cattle with lumpy skin disease. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 22(3),417-424.
- Basbug O, Aydogdu U, Agaoglu ZT. (2020). Neopterin and soluble urokinase type plasminogen activator receptor as biomarkers in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Hellenic Vet Med Soc.* 71(1),1945-1952.
- Başoğlu A, Şen İ, Sevinç M, Şimşek A. (2004). Serum concentrations of tumor necrosis factor- α in neonatal calves with presumed septicemia. *J Vet Med.* 18, 238-241.
- Baylan O, Albay A, Kisa Ö, Doğanç L. (2002). Prokalsitonin. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı.* Sayı:31.
- Baylan O, Balkan A, Inal A, Kisa O, Albay A, Dogancı L. (2006). The predictive value of serum procalcitonin levels in adult patients with active pulmonary tuberculosis. *Jpn J Infect Dis.* 59, 164-7.
- Caswell JL and Williams KJ. (2007). Respiratory system. Jubb eds. *Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* 5th ed. p.523-629.
- Cesur S, (2005). Enfeksiyonların izleminde kullanılan bir belirleyici: neopterin. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 39, 251-260.
- Çağlayan B, Salepçi B. (2012). Anti TNF- α kullanan hastalarda tüberküloz sıklığı. *Türk Toraks Derg.* 13, 93-98.
- Çiftçi MK, Ortatatl M, Erer H, Hatipoğlu F, Özdemir Ö. (2015). Veteriner sistemik patoloji. 1. Cilt. Konya: *Selçuk Üniversitesi Basımevi,* syf.157.
- Çımtay İ, Şahin T, Kaya NBA. (2000). Enzootik pnömonili besi sığırlarının tedavisinde kullanılan amoksisilinin etkinliğinin araştırılması. *YYÜ Vet Fak Derg.* 11, 113-116.
- Dagleish R, (1991). Differential diagnosis of respiratory disease in adult cattle. *In Practice.* 13(6), 237-241.
- Demirdağ K, Özden M, Gödekmerdan A, Cihangiroğlu M, Kalkan A. (2003). Sepsis olgularında prokalsitonin, tnf- α ve C-reaktif protein düzeylerinin değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi.* 16, 21-24.
- Demirtaş N, Ceylan E, Karadağ F, Polatlı M, Çıldıç O. (2012). Adalimumab Kullanımı ile ilişkili tüberküloz pnömonisi. *Tepecik Eğitim Hast Derg.* 22 -(3), 187-190.
- Dungworth DL, (1993). The respiratory system. Jubb KVF, Kennedy PC, Pamer N. eds. *Pathology of domestic animals.* Volume 2, fourth edition. *Academic Press,* San Diego. p.589-613.
- Ercan N, Tuzcu N, Başbuğ O, Gök K, Işıdan H, Oğrak YZ. (2014). The evaluation of important biomarkers in healthy cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 20(5), 749-755.
- Ergönül S, Aşkar T. (2009). Anaplasmosisli sığırlarda ısı şok protein (HSP), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve interlökin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 15(4), 575-579.
- Ertuğrul Ö, Ertuğrul MB. (2005). *Prokalsitonin ve enfeksiyon.* *Klinik Dergisi.* 18(2), 59-62.
- Fuchs D, Hausen A, Kofler M, Kosanowski H, Reibnegger G, Wachter H. (1984). Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis. *Lung.* 162, 337-346.
- Gourlay RN, Mackenzie A, Cooper JE. (1970). Studies of the microbiology and pathology of pneumonic lung of calves. *J Comp Pathog.* 80, 575-584.
- Hisaeda K, Hagiwara K, Eguchi J, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. (2001). Interferon-gamma and tumor necrosis factor- α levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 63(9), 1009-11.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H. (1984). Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med.* 160, 310-316.
- Jones TC and Hunt RD. (1983). *Veterinary Pathology.* 5th ed, Philadelphia, USA, Lea and Febiger.
- Kandemir Ö, Ulubaş B, Polat G, Sezer C, Çamdeviren H, Kaya A. (2003). Elevation of procalcitonin level in patients with pulmonary tuberculosis and in medical staff with close patient contact. *Arch Med Res.* 34, 311-4.
- Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* 345, 1098-104.
- Lopez A, Martinson AS. (2017). *Respiratory System.* Zachary JF. ed. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* Sixth edition, Elsevier, ST Louis.
- McGavin MD, Zachary JF. (2007). *Pathologic Basis Veterinary Disease.* 4th ed. By Mosby inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri. 63146, 500-530.
- Milli ÜH, Haziroğlu R. (2001). *Veteriner Patoloji. 2. Cilt.* 2.Baskı. Ankara: Tamer Matbaacılık, syf.31-104.
- Mohammed KH, Mobashe AA, Yousef AR, Salah A, El-Naggar IZ, Ghoneim AH, Light RW. (2001). BAL neopterin: a novel marker for cell-mediated immunity in patients with pulmonary tuberculosis and lung cancer. *Chest.* 119, 776-780.
- Ortatatl M, Çiftçi KM, Tuzcu M. (1998). Sığırlarda tüberküloz ve diğer granülatöz pnömoniler üzerinde patolojik incelemeler. *Vet Bil Derg.* 14(2), 139-150.
- Ortatatl M, (1997). Konya Bölgesi Mezbahalarında Kesilen Besi Danalarında Pnömonilerin İnsidensi ve Patolojisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Özçelik M, İssi M, Güler O, Şimşek H, Özdemir N, Kılıç A. (2014). Bakteriyel pnömonili besi sığırlarında oluşan serbest

- radikal hasarının antioksidan aktivite ve bazı mineral maddeler üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 11(2), 111-116.
35. Özkan M, Yükselol İ. (2003). Nitrik oksit ve akciğer. *Toraks Derg.* 4(1), 88-94.
36. Özyurt B, Iraz M, Koca K, Özyurt H, Sahin S. (2006). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Cel Bioch.* 292, 197-203.
37. Radelli E, Luini M, Loria GR, Nicholas RAJ, Scanziani E. (2008). Bacteriological serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves adult cattle at slaughter. *Res Vet Sci.* 85, 282-290.
38. Rahman I, Van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, Macneew DE, Boer WI. (2002). 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product is elevated in lung of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 166, 490-5.
39. Stang BV, Koller LD. (1998). Neopterin values in selected groups of normal animals. *Res Vet Science.* 65, 87-88.
40. Stenger S, Modlin RL. (2002). Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 14, 452-7.
41. Tozkoparan E, Deniz O, Cakir E, Yaman H, Çiftci F, Gumus S, Ozcan O, Akgul OE, Bilgic H, Erbil K, Ekiz K. (2005). The diagnostic values of serum, pleural fluid and urine neopterin measurements in tuberculous pleurisy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 9, 1040-5.
42. Tüközkan N, Erdamar H, Seven I. (2006). Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. *Fırat Tıp Dergisi.* 11, 88-92.
43. Ünlü M, Akkaya A. (1999). Reaktif oksijen metabolitleri ve akciğer hastalıkları. *Sol Hast Derg.* 10, 207- 11.
44. Yılmaz R, (2009). Sığırlarda *Mycoplasma bovis* Pnömonilerinde Histopatolojik İmmunohistokimyasal Bulgular. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
45. Yüksekol I, Ozkan M, Akgul O, Tozkoparan E, Al-Rashed M, Balkan A, Hatipoğlu K, Bilgic H, Erbil K, Demirci N. (2003). Urinary neopterin measurement as a non-invasive diagnostic method in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 7, 771-6.
46. Watcher H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. (1989). Neopterin as a marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem.* 27, 81-141.



Adaptation of Contagious ecthyma vaccine strain to MDBK cell culture and stability-immunity studies in lambs

Veli Gülyaz¹, Fahriye Saraç², Esra Satır³, Serdar Uzar⁴, Eray Atıl⁵

¹ General Directorate of Food and Control, Ministry of Agriculture and Forestry, Çankaya, Ankara, Turkey,
^{2,3,4,5} Pendik Veterinary Control Institute, Pendik, Istanbul, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 13.03.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 12.05.2020

Abstract: Contagious ecthyma (CE) is a common viral infection in lambs and kids, and still maintains its importance in sheep and goat breeding. Attenuated, live and lyophilized CE vaccines adapted to cell culture are widely used in the fight against CE. The aim of this project was to adapt the CE vaccine strain to Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) cell culture and to produce the vaccine, as well as determining the shelf life, stability, innocuity, and immune response in lambs. The titer of the vaccine virus adapted to the MDBK cell culture was determined to be TCID₅₀ 10^{6.5}/ml. In the innocuity study on mice and guinea pigs, no local or general reactions were observed. Body temperature of 10 lambs vaccinated by scarification was found to be between normal values (38.2-39.1°C). Neutralizing antibodies belonging to CE virus with VNT could not be detected in blood sera taken on 30th day following the vaccination. As a result of challenge performed with pathogen (E(P)CK_s) CE virus, the protection was observed against CE infection in vaccinated lambs. In the stability study, the titers of lyophilized CE vaccine were found to be TCID₅₀ 10^{6.5}/ml from 1 to 15 months and 10^{6.0}/ml at 18, 21 and 24 months during the 24-month storage period at +4/+8°C. It was determined that the vaccine virus remained as stable at TCID₅₀ 10^{6.5}/ml titer for 12 hours at 30, 33, 37 and 40°C and after 12 hours, the virus titer regressed to TCID₅₀ 10^{5.75}/ml at 42°C and 45°C. This study concluded that CE vaccines could be produced in MDBK cell cultures by adapting CE virus to MDBK cell culture.

Key words: Contagious ecthyma, immunity, stability, vaccine, virus

Ecthyma contagiosa karşı MDBK hücre kültüründe aşı üretimi ve bağışıklık-stabilite çalışmaları

Özet: Contagious ecthyma (CE), kuzu ve oğlaklarda yaygın viral bir enfeksiyondur ve hala koyun ve keçi yetiştiriciliğinde önemini korumaktadır. Hücre kültürüne adapte canlı ve liyofilize CE aşıları mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu proje CE aşı suşunun Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürüne adapte edilmesi ve MDBK hücre kültüründe üretimi yapılan CE aşısının raf ömrü, stabilite ve kuzularda bağışıklık düzeyinin saptanması amacıyla gerçekleştirildi. MDBK hücre kültürüne adapte edilen aşı virüsünün titresinin DKID₅₀ 10^{6.5}/ml olduğu belirlendi. Fareler ve kobaylarda yapılan zararsızlık çalışmalarında lokal veya genel reaksiyonlar gözlenmedi. Scarifikasyon yoluyla aşılanan 10 kuzunun vücut ısılarının normal değerler (38.2-39.1°C) arasında olduğu tespit edildi. Aşılamayı izleyen 30. günde alınan kan serumlarında VNT ile CE virüsüne karşı oluşan nötralize edici antikorlar tespit edilemedi. Patogen CE virüsü (E(P)CK_s) ile yapılan challenge sonucunda aşılanmış kuzuların CE enfeksiyonuna karşı korunduğu gözlemlendi.

Stabilite çalışmasında, +4 /+8°C'de 24 ay süreyle muhafaza edilen liyofilize CE aşısı titrelerinin 1-15. aylar arasında DKID₅₀ 10^{6.5}/ml ve 18, 21 ve 24 aylarda ise 10^{6.0}/ml olduğu tespit edildi. Aşı virüsünün 30, 33, 37 ve 40°C'lerde DKID₅₀ 10^{6.5}/ml titrede 12 saat stabil kaldığı ve 12 saat sonra virüs titresinin 42 ve 45°C'lerde DKID₅₀ 10^{5.75}/ml'ye gerilediği tespit edildi. Bu çalışma sonucu, CE aşı virüsünün MDBK hücre kültürüne adapte edilmesi ile CE aşılarının MDBK hücre kültürlerinde üretilebileceği sonucuna varmıştır.

Anahtar kelimeler: Aşı, bağışıklık, contagious ecthyma, stabilite, virus

Introduction

Also known as Orf, Ecthyma contagiosum, Sore mouth, Scabby mouth, Contagious pustular dermatitis, dermatitis pustulosa of small ruminants, ulcerative dermatosis of sheep, lip and leg ulceration is a viral disease caused by Parapoxvirus ovis (Rabinson and Balassu (1981). Parapoxvirus infections (PPV) are

seen in sheep, goats, deer and humans (Mazur et al. 2000; Haig and Melnnes 2002). Contagious ecthyma (CE) is seen in South and North America, New Zealand, Netherlands, Germany, Norway, Japan, Italy, UK, Western Australia, South Asia, and our country (Nettleton et al. 1996; Hosamani et al. 2006). Contagious ecthyma virus (CEV) is morphologically and immunologically in close relationship with cattle's

Yazışma adresi / Correspondence: Doç. Dr. Veli GÜLYAZ, Üniversiteler Mah. Dumlupınar Bulvarı, No: 161, Çankaya/ANKARA
E-mail: veligulyaz@yahoo.co.uk ; veli.gulyaz@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-0077-6071 • ²0000-0001-5854-1676 • ³0000-0001-8607-3873
⁴0000-0002-0120-7148 • ⁵0000-0003-1923-1186

parapoxviruses and has a diameter of about 300-350 nm x 200-250 nm (Buddle et al. 1984; Mazur et al. 2000; Chan et al. 2007). As a result of genomic studies with DNA restriction enzymes, heterogeneity has been detected between strains. CE virus reproduces in ovine, bovine and human cell cultures. The best titer was obtained in the ovine primary cell lines derived from sheep for multiplication of the virus (Ivanov et al. 2016). The primary lamb kidney (PLK) and primary lamb testis (PLT) are the most commonly used cells for virus isolations (Ergin and Köklü 1973). Other cell lines include ovine testis cells (OA3.Ts), Vero, ovine organotypic skin culture, ovine fetal turbinate (OFTu) cells, BHK-21, and Madin-Darby ovine kidney cells (Scagliarini et al. 2005). The permanent cell lines also favor the multiplication of the virus, but titer yield is comparatively lower. Within 2-3 days, the virus titer reaches its maximum level and typical cytopathic effects such as rounding, pyknosis, ballooning and detachment of cells, are observed at the same time. (Karki et al. 2019)

The virus remains viable for many years especially in dried skin lesion scabs. In fact, it may remain viable for 17 days at room temperature in purified tissues. Virus is inactivated in 2 minutes at 64°C. Effective disinfectants include creolin and chloramine (Rabinson and Balassu 1981; Hussain and Burger 1989).

Small ruminants, wild ruminants, chamois, llamas and humans are sensitive to CE virus. There is no evidence of calves contracting the disease. The transmission of the disease can be by direct contact or indirectly by potable water or feed. The disease is common in sheep and goats, especially in dry seasons during the feeding period with dry herbs. The CE virus is an epitheliotropic virus that enters the damaged or scarified skin and reproduces in regenerative epidermal keratinocytes. The infection is usually acute and sometimes chronic infections have also been reported. In sheep and goats, CE is observed clinically in the form of macules, papules, vesicles, pustules and proliferative lesions in the mouth, nose, gums, oral mucosa, udders, coronary band of the feet and anus (Mc keever et al. 1988; Ameel et al. 1995; Nourani and Maleki 2006). Primary infections can be severe and common, and lesions usually resolve within 6-8 weeks. It can also be seen on the broken horn bottoms of animals (Haig and Melnnes 2002). Another feature of the disease is that it causes venereal balanoposthitis and vulvitis. CE infection is seen especially in spring and summer seasons, but it can be seen in lambs and kids in every season of the year. Its prevalence

is low in old sheep and goats. This may be due to both the survival of the animals and the vaccination (Rabinson and Balassu 1981; Ergin and Köklü 1995). The reason for the disease to be seen in udders in sheep and goats can usually be the transmission of virus from mouth lesions while infected lambs and kids are breastfeeding. Incubation period varies from 24 to 72 hours in experimental infections. Morbidity is very high and can reach up to 100%. Mortality is up to 1% in cases where there is no complication. Mortality is 20-50% in case of secondary infections. Complications mostly involves *Cochliomyia Americana* and *Fusobacterium Tunnickliffle* (Rabinson and Balassu 1981; Sowmiya et al. 2018). In lambs, the disease occurs when the lambs that suck milk from infected udders receive the virus, and it spreads rapidly in the herd. Sheep are natural reservoirs of the disease. If sheep and llamas are kept together, llamas can get infected. For the diagnosis of the disease, virus isolation, PCR, electron microscopy, indirect immunofluorescence and other serological tests can be used in tissue cultures. Delayed hypersensitivity test is among sensitive tests (Ergin and Köklü 1973; Mondal et al. 2006).

For the prevention of disease, attenuated tissue culture and vaccines that are not fully attenuated and produced in sheep are used (Pye D 1990; Musser et al. 2012)

The aim of this study was to adapt the CE vaccine strain to Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) cell culture and to produce the vaccine, as well as determining the shelf life, stability, innocuity, and immune response in lambs.

Materials and Methods

Contagious ecthyma (CE) virus strains: CE vaccine strain at 17th passage level (EP(CK)₁₇) and pathogen field virus (EP(CK)₅) propagated in primary calf kidney cell culture were obtained from the contagious ecthyma vaccine production laboratory in Pendik Veterinary Control Institute.

Cell culture: MDBK was obtained from Ankara foot and mouth disease (FMD) institute (Sap Enstitüsü). To propagate MDBK cells, fetal calf serum inactivated at 56°C for 30 minutes (BIOCHROM-cat no: S-0125) was added to DMEM/Ham's-F-12 (BIOCHROM-cat no: F 4815) medium as 10% and 2% for virus production (Burlson et al. 1992).

DNA Extraction Kit: Commercial viral DNA extraction kit was used in accordance with the protocol specified by the manufacturer (Roche, High Pure ViralNucleic Acid Kit, cat.no: 11858874001).

PCR: Pan-parapoxvirus primers were used to partially amplify the major envelope membrane protein gene (B2L) by semi-nested PCR (Table 1) (Inoshima et al. 2000; Sullivan et al. 1994). As positive control, CE vaccine virus was obtained from Viral Vaccines Production Laboratory at Pendik Veterinary Control institute. 2xPCR master mix by Norgen was used for semi-nested PCR (Norgen, cat.no: 28007).

Table 1. Primers used to partially amplify the B2L gene (Sullivan et al. 1994; Inoshima et al. 2000)

Primers	Primer sequence (5'-3')
PPP1	GTCGTCCACGATGAGCAGCT
PPP4	TACGTGGGAAGCGCCTCGCT
PPP4	GCGAGTCCGAGAAGAATACG

DNA extraction and PCR: 200 µl of the prepared inoculum was used for DNA extraction. DNA extraction was performed according to the kit protocol using reference CE vaccine virus DNA as positive control. To partially amplify the B2L gene, the master mix was done as shown in tables 2 and 3, and the temperature-time cycles were done as shown in table 4 (Inoshima et al. 2000).

Table 2. Master mix content round 1

1 Sample	Quantity (µl)
Enzyme	10
PPP1	0.5
PPP4	0.5
Nuclease-free water	6
Sample DNA quantity	3
TOTAL	20 µl

Table 3. Master mix content round 2

1 Sample	Quantity (µl)
Enzyme	10
PPP3	0.5
PPP4	0.5
Nuclease-free water	6
PCR product from the first round	3
TOTAL	20 µl

In the first and second round of amplification, a product of 594 bp and 235 bp was obtained respectively.

Preparation of MDBK cell culture: MDBK cell culture stored in nitrogen tank was rapidly dissolved in water bath at 37°C and diluted with DMEM-Ham's F-12 medium containing 10% FCS at 37°C to have 3x10⁵/ml cells. 7.5 ml of it was then placed in 25

cm² flasks. The flasks were incubated at 37°C and in 5% CO₂ medium for the formation of monolayer cell culture and the cells were checked for reproduction daily. MDBK cell culture produced was used as working cell culture (Ergin and Köklü 1975; Burlleson et al. 1992).

Table 4. PCR temperature-time cycle

	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Denaturation	94	2 min	1
PCR Amplification (a total of 40 cycles)			
Denaturation	94	20 sec	
Binding	56	20 sec	30
Elongation	72	1 min	
Final elongation	72	5 min	1

Adaptation of CE vaccine virus (EP)CK₁₇ to MDBK cell culture: For this purpose, the MDBK cell culture surfaces produced as monolayer in flasks of 75 cm² were washed 3 times with PBS, and CE vaccine strain (E(P)CK₁₇) (2.5 ml) at TCID₅₀ 10^{4.0}/ml titers was inoculated in to 2 flasks. The flasks were incubated at 37°C for the absorption of the virus into the cells. One hour later, the inoculum was taken with a pipette and DMEM-Ham's F-12 medium with 2% FCS was placed in each flask. When 80-90% cytopathic effect (CPE) was observed in cells (within 4-8 days), flasks were frozen and thawed 3 times at -70°C (Ergin and Köklü 1973; Burlleson et al. 1992; Musser et al. 2008). Serial passages of Ecthyma (EP)CK₁₇ vaccine virus were performed 5 times in MDBK cell culture (E(P)CK₁₇-MDBK₅). Following the serial passages, the E(P)CK₁₇-MDBK₃ passage of the ecthyma vaccine virus was named and stocked as master seed virus and the E(P)CK₁₇-MDBK₄ passage was named and stocked as the working seed virus (Ergin and Köklü 1975; Burlleson et al. 1992).

Production of ecthyma (E(P)CK₁₇-MDBK₅) vaccine

Production of MDBK cell culture: MDBK cell culture stored in nitrogen tank was rapidly dissolved in water bath at 37°C and diluted with DMEM-Ham's F-12 medium containing 10% FCS at 37°C to have 3x10⁵/ml cells. The cells was then placed in 25 cm² flasks. The flasks were incubated at 37°C with 5% CO₂ for the formation of monolayer cell culture and the cells were checked for reproduction daily. Monolayer cell cultures were prepared by passaging MDBK cells produced in flasks of 75, 175 and into

roller bottles (2 liters capacity), respectively (Ergin and Köklü 1975; Burleson et al. 1992).

Production of Ecthyma working seed virus:

One ml (TCID₅₀ 10^{4.0}/ml) of E(P)CK₁₇-MDBK₄ working seed vaccine virus was applied to MDBK cell cultures produced as monolayer in disposable roller bottles, which were then incubated for 1 hour at 37°C for adsorption of the virus. At the end of the period, the surface of the cells was washed 3 times with PBS and the cell cultures were incubated at 37°C by adding DMEM-Ham's F-12 medium containing 2% FCS. When 80-90% cytopathic effect (CPE) was observed in cells (within 4-8 days), bottles were placed in the freezer at -20°C (Ergin and Köklü 1975; Burleson et al. 1992).

Collection of CE final product (E (P) CK₁₇-MDBK₅): Bottles containing virus suspension in the freezer were frozen and thawed 3 times in a 37°C water bath. The virus suspension was centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes and collected for use as the upper liquid vaccine, and sterility, identity and titer control tests were performed (Ergin and Köklü 1975; Burleson et al. 1992; Musser et al. 2008).

Lyophilization: The CE virus suspension was mixed with an equal amount of preservative solution that was freshly prepared with 5% LAH and 10% sucrose. 2 ml aliquots of this mixture were put in 5 ml bottles and lyophilized. Titration of vaccine was performed by taking samples from these bottles. Log₁₀ 0.5 drop per milliliter was considered normal (Ergin and Köklü 1975; Musser et al. 2008).

Detection of titer of lyophilized CE vaccine (E(P)CK₁₇-MDBK₅): Microvirus titration test was performed to determine the TCID₅₀/ml of lyophilized CE (E(P)CK₁₇-MDBK₅) vaccine virus. Using phosphate buffered saline (PBS), 10-fold dilutions of CE virus from 10⁻¹ to 10⁻⁶. The 100 µl of each dilution was put in four wells of the 96-well plate. 50 µl of MDBK cell culture (3-5x10⁵ cells/ml) was added to all dilutions. For the purpose of cell control, 100 µl of medium and 50 µl of cell suspension were placed in the last four wells of the plate. The plate was put in to incubator at 37°C with 5% CO₂ and incubated for 10 days. CPE formation due to virus multiplication was observed. The titer of CE vaccine virus were determined according to the Spermen-Kaerber method (Ergin and Köklü 1974; Burleson et al. 1992; Nashiruddullah et al. 2016).

Determination of stability of CE vaccine strain at different temperatures: For this purpose, 10 lyophilized CE vaccines for each temperature were diluted with 10 ml of PBS and incubated at 30,

33, 37, 40, 42 and 45°C for 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours to determine their titers.

Innocuity and immunity studies of CE (E(P)CK₁₇-MDBK₅) vaccine virus

Innocuity test in mice and guinea pigs: For this test, 6 guinea pigs weighing 250-350 g and 10 mice weighing 17-22 g were used. At least 5 lyophilized vaccines were diluted with PBS (0.5 ml/one dose). Two guinea pigs were injected intramuscularly with 0.5 ml and 2 other guinea pigs were injected intraperitoneally with 0.5 ml. Two guinea pigs were separated as controls (mock). In addition, 6 mice were injected intravenously with 0.1 ml of CE vaccine suspension and 4 mice remained as controls. Mice and guinea pigs were observed for 1 week. At the end of the observation period, experimental animals were necropsied (Ergin and Köklü 1973).

Immunity studies in lambs: Before the study, the lambs aged, 2-3 months old, which had no contagious ecthyma disease and had no clinical symptoms of contagious ecthyma disease, blood was collected and blood serums were obtained to check antibody titers against the contagious ecthyma virus by VNT. The lambs were kept in quarantine for 10 days before the trial and their daily body temperatures were recorded.

Vaccination of lambs: Lyophilized CE (E(P)CK₁₇-MDBK₅) vaccine was diluted with dilution fluid containing 40 ml PBS (50%) + glycerin (50%). Scarification was performed diagonally by 3-4 scratches with a diameter of 0.5-1 cm with a needle deep enough to pass the first layer in the hairless skin region of the hind legs of 10 lambs. Three drops of the diluted CE vaccine were applied to the scarified areas and the vaccination was completed by waiting for 3-4 seconds. Four lambs to be used as controls (mock) were also scarified diagonally by 3-4 scratches with a diameter of 0.5-1 cm with a needle deep enough to pass the first layer in the hairless skin region of the hind legs. Three drops of PBS (50%) + glycerin (50%) were applied to the scarified areas and the animals were released after 3-4 seconds (Ergin and Köklü 1973; Buddle and Pulford, 1984; Pye 1990; Musser et al. 2012). Body temperature of the animals were measured 2 times a day for 15 days. The skin area to which the vaccine was applied was checked for necrosis, hyperemia and contagious ecthyma disease symptoms.

Challenge studies in vaccinated lambs: The blood samples were collected from the vaccinated and control lambs at 30th day after the CE vaccina-

tion and separated to determine the antibody titers against CE virus. Ten lambs vaccinated with the CE vaccine and 4 non-vaccinated control (mock) lambs were challenged by the scarification of inguinal region with E(P)CK₅ pathogen CE virus at a titer of at least ID₅₀10^{3.2}/ml. For this purpose, 10 ml of E(P)CK₅ pathogen CE virus was mixed equally with 10 ml of PBS (50%) + glycerin (50%) and vaccinated lambs were challenged by applying 3 drops into the scarified skin inside the hind legs. Body temperatures of lambs were daily measured for 15 days. Following the challenge, vesicles, pustules and subsequent scabbing caused by virus reproduction were observed in the scarification areas on the skin of the control lambs, which were challenged at the same time with vaccinated lambs (Ergin and Köklü 1973; Buddle and Pulford, 1984; Pye, 1990; Musser et al. 2012).

Virus neutralization test (VNT): Antibody titer levels against CE virus were determined by microvirus neutralization test. For this purpose, 50 µl of DMEM/F12 Ham's medium was placed in all wells of 96-well plates. 50 µl of blood serum of each lamb and kid was placed in the first four wells of the plate. 50 µl from the first wells were transferred to the bottom wells to make two-fold dilutions of the serum. To the serum samples, which were diluted two-folds in the wells, were added 50 µl of standard CE virus (E(P)CK₅) strain at 100 DKID₅₀ titers and they were let to neutralize at 37°C for one hour. At the end of the incubation period, 50 µl of MDBK cell culture was added to all wells and incubated at 37°C with 5% CO₂ incubator for 10 days. Cells were checked daily for CPE formations (Ergin and Köklü 1973; Nashiruddullah et al. 2016).

Results

The titer of the E(P)CK₁₇-MDBK₅ vaccine virus adapted to the MDBK cell culture (Figure 1) was determined to be TCID₅₀ 10^{6.5}/ml (Figure 2). In the innocuity study with mice and guinea pigs, no local or general reactions were observed and no abnormal findings were detected in the necropsy. Body temperature of 10 lambs vaccinated by scarification was found to be between normal values (38.2-39.1°C). No neutralizing antibodies belonging to CE virus with VNT could be detected in blood sera taken on day 30 following the vaccination. As a result of challenge performed with pathogen E(P)CK₅ CE virus, vaccinated lambs were observed to have no lesions caused by the reproduction of the pathogen ecthyma virus in their scarified skin areas. Thin small scabs caused by scarification have fell out within 3-4 days. On the other hand, it was observed that vesicles and

pustules were formed due to CE virus reproduction in challenged skin areas of non-vaccinated control animals 2-3 days after scarification and that subsequent scabs started to fall out on day 24 (Figure 3).

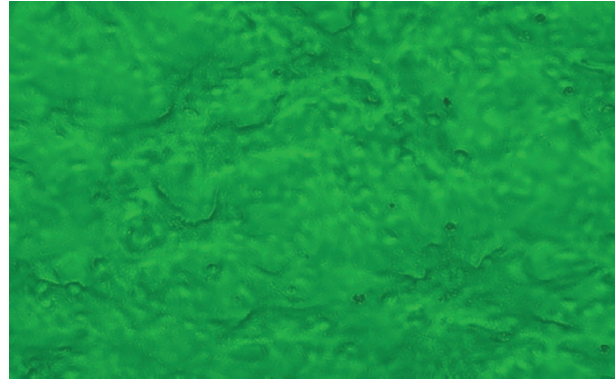


Figure 1. MDBK control cell culture

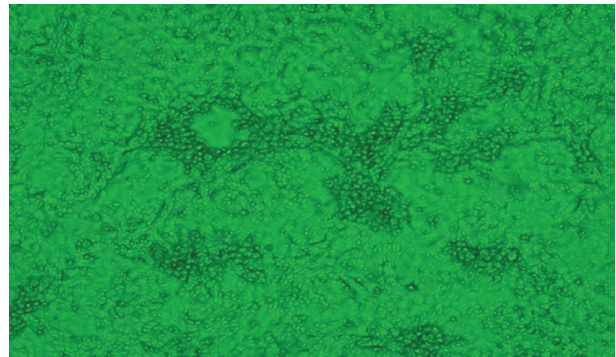


Figure 2. MDBK cell culture CPE (+)



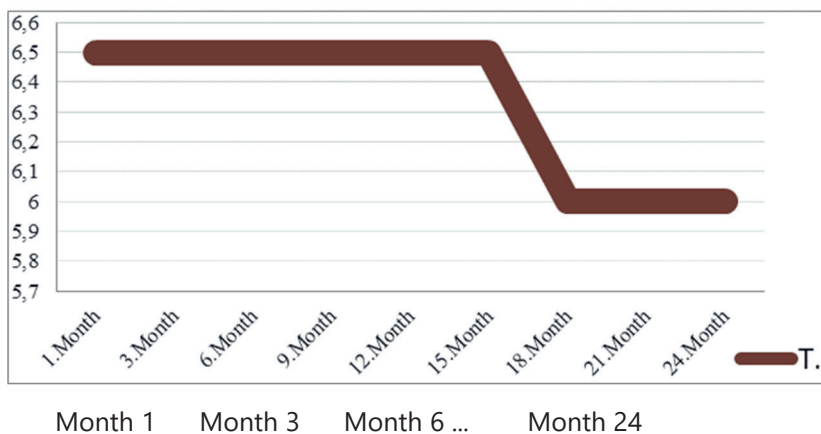
Figure 3. Skin lesion after challenge in control lambs (day 6)

The titer of Lyophilized CE vaccine was found to be as DKID₅₀ 10^{6.5}/ml from 1 to 15 months and 10^{6.0}/ml at 18, 21 and 24 months during the 24-month storage period at + 4/+8°C (Figure 1). In the stability study of the lyophilized CE vaccine it was determined that the vaccine virus remained the stable at a titer of TCID₅₀10^{6.5}/ml at 30, 33, 37 and 40°C at 1, 2,

4, 6, 8, 10 and 12 hours. It was found that the titer, which declined to $TCID_{50} 10^{6.0}/ml$ at the 8th hour after incubation, decreased to $DKID_{50} 10^{5.75}/ml$ at 42°C and 45°C as from the 12th hour (Table 5).

Table 5. The results of heat stability study for CE vaccine strain

Temperature	Hour 1 (ml)	Hour 2 (ml)	Hour 4 (ml)	Hour 6 (ml)	Hour 8 (ml)	Hour 10 (ml)	Hour 12 (ml)
30°C	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$
33°C	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$
37°C	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$ <td $10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	
40°C	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$
42°C	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.0}$	$10^{6.0}$	$10^{5.75}$
45°C	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{6.0}$	$10^{5.75}$	$10^{5.75}$



Graphic 1. Heat stability study results for Ecthyma vaccine

Discussion and Conclusion

Contagious ecthyma (CE) is a common viral infection in lambs and kids in our country, and still maintains its importance in sheep and goat breeding. Attenuated, live and lyophilized CE vaccines adapted to cell culture are used in the fight against this disease. The CE vaccine strain (E(P)CK₂₂) used in the fight against CE disease in our country was isolated from the lip lesions of a lamb infected with CE in 1975 and was attenuated by passaging 22 times in primary calf kidney cell culture.

In the production of CE vaccines, 1-3 month calves are slaughtered for each series of vaccine production, primary cell culture is prepared from the kidneys under sterile conditions, and vaccine is produced by cultivating the vaccine strain when a complete monolayer is formed. However, it is difficult to produce sufficient amount of vaccines because vaccine preparation with kidney cells obtained from calves has a contamination risk with especially pestivirus, blue tongue viruses, PPR virus, Parainfluenza 3, and akabane viruses to vaccinated

animals. The aim of this project was to adapt the CE vaccine strain produced in primary calf kidney cell culture to MDBK cell culture and to produce the vaccine, as well as determining the shelf life, stability, innocuity, and immune response in lambs.

In the production of CE virus, primary cell and cell line cultures are used and different virus titers (between $10^{4.2}$ and $10^{7.6}$ $TCID_{50}/ml$) are obtained in these cell cultures (Mercante et al. 2008; Wang et al. 2019; Galante et al. 2019). A study by Wang et al. (2019) reported that, in the CE virus production, bovine sertoli cells are more sensitive than primary neonatal bovine testicular cells and Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell lines, and the CE virus titers were approximately 1 log higher in bovine Sertoli cells ($TCID_{50} 10^{6.55}/ml$) compared to MDBK ($TCID_{50} 10^{5.10}/ml$) and primary neonatal bovine testicular ($TCID_{50} 10^{5.50}/ml$) cells.

Mercante et al. (2008) reported that 10 serial passages of CE virus were performed to obtain attenuated CE working seed virus and CE virus was obtained at $10^{4.2}$ $TCID_{50}/ml$ titers in primary chicken

embryo fibroblasts cell culture. In addition, the researchers found in the immunity studies of the lyophilized CE vaccine virus that sufficient immunity occurred in animals with CE virus at $10^{4.5}$ TCID₅₀ per dose. Nashiruddullah et al. (2010) reported that the titer of the reference CE vaccine virus produced in continuous fetal lamb testicular cell culture was found as $10^{5.75}$ TCID₅₀/ml. In this study, it was found that the post-production titers of CE virus produced in the MDBK cell culture (DKID₅₀ $10^{6.5}$ /ml) were higher than the titers reported by other researchers. It has been reported that the amount of virus in lyophilized form CE vaccines should be at least DKID₅₀ $10^{4.5}$ /ml for the protection of lambs against CE infection. This study determined that the titer of CE vaccine virus produced in MDBK cell culture after lyophilization was similar to the values reported by other researchers (Ergin and Köklü 1973; Ergin and Köklü 1975; Buddle and Pulford 1984; Nashiruddullah et al. 2010; Gülyaz et al. 2012). At the end of the challenge study, it was seen that there was not any lesions caused by pathogen CE virus on the skin of vaccinated lambs. According to this result, it was concluded that vaccinated lambs are immune to CE infection.

Following the production of veterinary vaccines, real-time shelf life is required before administration in the field. This study determined that the titers of ecthyma vaccines, which were kept at +4/+8°C for 24 months, decreased from DKID₅₀ $10^{6.5}$ /ml to DKID₅₀ $10^{6.0}$ /ml at the end of the 24th month, and the titers detected were sufficient to provide sufficient immunity in the lambs after vaccination. (Ergin and Köklü 1973; Ergin and Köklü 1975; Buddle and Pulford 1984; Gülyaz et al. 2012).

One of the most important criteria for insufficient immunity in animals is the reduction of live virus titers in lyophilized vaccines during the administration of vaccines in the field, especially due to environmental temperatures. Therefore, it is necessary to know the stability of live lyophilized vaccines in the field against environmental temperatures under field conditions. This study showed that the lyophilized CE vaccine remains stable at 45°C for 12 hours after the dilution means that it will remain at sufficient titers to immunize animals adequately in the field despite the high ambient temperatures.

In conclusion, this study shown that the vaccine produced in the MDBK cell culture provides sufficient immunity against CE virus in lambs. In addition, this study concluded that it would be appropriate to produce CE vaccines in MDBK cell cultures since the real-time shelf life of the lyophilized CE vaccine is 24

months, the vaccine virus remains stable at 42-45°C for up to 12 hours after dilution with the vaccine reconstitution fluid.

Acknowledgement

This project was supported by the Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies (TAGEM/HSYGAD/14/A07/P02/42).

Author Contributions

VG and FS designed the experiments, FS, VG, SU, EA and FS carried out the experiments, VG and FS analysed the data and wrote the paper.

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

Animal and Human Rights Statement: This study was conducted under the supervision of the General Directorate of Agricultural Research and Policies of the Ministry of Agriculture and Forestry. In addition, permission (85/09) was obtained from the ethics committee of experimental animals of Istanbul Pendik Veterinary Control Institute.

References

- Buddle BM and Pulford HD. (1984). Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet Microbiol.* 9, 515-522.
- Buddle BM, Dellers RW, Schuring GG. (1984). Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. *Am J Vet Res.* 45, 75-79.
- Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. (1992). *Virology Laboratory Manual.* First edition. Academic Press. California. p. 20-61.
- Chan KW, Lin JW, Lee SH, Liao CJ, Tsai MC, Hsu WL, Wong ML, Shih HC. (2007). Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan. *Virus Genes.* 35 (3), 705-12.
- Ergin H, Köklü A. (1973). Ektima virusunun doku kültürlerinde pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi. *Pendik Vet Kont ve Araşt Enst.* 6 (2), 12-20.
- Ergin H, Köklü A. (1975). Pendik orijinli ektima suşunun pasajı, aşı hazırlama imkanları ve bu aşının immunite süresinin tayini. *TÜBİTAK (VHAG).* Proje no: 207.
- Gameel AA, Abu Elzein EME, Housawi FMT, Agip A, Ibrahim A. (1995). Clinico-pathological observations on naturally occurring contagious ecthyma in lambs in Saudi Arabia. *Revue Elev Med Vet Pays Trop.* 48(3), 233-235.
- Gülyaz V, Hasöksüz M, Bulut M, Saraç F. (2012). Contagious ecthyma virus (CEV) oğlak izolatlarının moleküler karakterizasyonu ve ecthyma aşı suşu arasında çapraz koruma çalışmaları. *TÜBİTAK.* Proje no: 111O398.
- Haig DM, Melnes CJ. (2002). Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Research.* 88, 3-16.
- Hosamani M, Bhanuprakash V, Scagliarini A, Sing RK. (2006). Comparative sequence analysis of major envelope protein

- gene (B2L) of indian orf viruses isolated from sheep and goats. *Vet Microbiol.* 116, 317-324.
11. Housawi FMT, Abu Elzein EME, Gameel AA, Ala Faleg AI. (1993). A close comparative study on the response of sheep and goats to experimental orf infection. *J Vet Med.* 40, 272-282.
 12. Hussain KA and Burger D. (1989). In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. *Vet Microbiol.* 19, 23-36.
 13. Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H. (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 84, 201-208.
 14. Ivanov L, Hristov M, Peshev R. (2016). Studies on cultural characteristics of contagious ecthyma (orf) virus. *Bulg. J Vet Med.* 19, 308-316.
 15. Karki M, Venkatesan G, Kumar A, Kumar S, Bora PD. (2019). Contagious ecthyma of sheep and goats: A comprehensive review on epidemiology, immunity, diagnostics and control measures. *Vet Arhiv.* 89(3), 393-423.
 16. Mazur C, Ferreira II, Rangel Filho FB, Galler R. (2000). Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet Microbiol.* 73, 253-259.
 17. McKeever DJ, Reid HW, Ingus NF, Herring AJ. (1987). A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Vet. Microbiol.* 15, 229-241.
 18. Mercante MT, Lelli R, Gaetano Federico Ronchi GF, Pini A. (2008). Production and efficacy of an attenuated live vaccine against contagious ovine ecthyma. *Vet Ital.* 44 (3), 543-547.
 19. Mondal B, Bera AK, Hosamani M, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK. (2006). Detection of orf virus from an outbreak in goats and its genetic relation with other parapox viruses. *Vet Res Commun.* 30, 531-539.
 20. Musser JMB, Waldron DF, Taylor CA. (2012). Evaluation of homologous and heterologous protection induced by a virulent field strain of orf virus and an orf vaccine in goats. *Am J Vet Res* 73(1), 86-90.
 21. Musser JMB, Taylor CA, Gua J, Tizard IR, Walker JW. (2008). Development of a contagious ecthyma vaccine for goats. *AJVR.* 69(10), 1366-1370.
 22. Nashiruddulllah N, Pathak DC, Barman NN, Ahmed JA, Rajbongshi G, Sharma RK, Borah P, Begum SS. (2016). Evaluation of orf virus (ORFV) isolation in continuous lamb testis cells (OA3.Ts) and development of a co-culture method with infected cells to increase infectivity. *Indian J Anim Res.* 50(6): 951-957.
 23. Nettleton PF, Brebner J, Pow I, Gilray JA, Bell G.D, Reid HW. (1996). Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Vet Rec.* 138, 184-186.
 24. Nourani H and Maleki M. (2006). Contagious ecthyma: case report and review, *Pak J Biol Sci.* 9(13), 2543-2545.
 25. Pye D. (1990). Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus, *Aust Vet J.* 67:182-183.
 26. Rabinson AJ and Balassu TC. (1981). Contagious pustular dermatitis (orf). *Vet Bull.* 51(10), 771-782.
 27. Rafii F and Burger D. (1984). Comparison of contagious ecthyma virus genomes by restriction endonucleases. *Arch Virol.* 84, 283-289.
 28. Scagliarini A, Pozzo FD, Gallina L, Guercio A, Clercq E.D, Snoeck R, Andrei G. (2005). Ovine skin organotypic cultures applied to the ex vivo study of orf virus infection. *Vet. Res. Commun.* 29, 245-247.
 29. Sullivan JT, Mercer AA, Fleming SB, Robinson AJ. (1994). Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Virology.* 202, 968-973.
 30. Wang G, Wang Y, Kong J, Li Y, Wu J, Chen Y, Liu X, Shang Y, Zhang Z. (2019). Comparison of the sensitivity of three cell cultures to ORFV. *BMC Vet Res.* 15:13.
 31. Zamri SM, Rashidah I, AL-Ajeeli KSA. (1994). Experimental cross-infection of sheep and goats with different isolates of contagious ecthyma virus. *Aust Vet J.* 71(7) 218-220.



Türkiye'nin Muğla ili Datça ilçesinde sahipli köpeklerde pire enfestasyonları

Mehmet Acıöz¹ , Mehmet Fatih Aydın² 

¹ İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Datça, Muğla

² Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Halk Sağlığı Hemşireliği AD, Karaman

Gelis tarihi / Received: 11.11.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 02.05.2020

Özet: Pireler, erişkin dönemlerinde insan ve hayvanlardan kan emerek beslenen, ılıman bölgelere iyi adapte olmuş ve tam metamorfoz geçiren geçici parazitlerdir. Birçok hastalığa neden olan pireler, köpeklerde yaygın olarak gözlenmektedir. Pireler aynı zamanda birçok hastalık etkenine de vektörlük yapmaktadır. Bu çalışma ile Muğla ili Datça ilçesinde sahipli köpeklerde pire enfestasyon durumlarını, ilişkili risk faktörleri ve enfestasyona neden olan türlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 2018 yılında 142 köpekte pire taraması yapılmış ve toplanan pirelerin kalıcı preparatları hazırlanarak ışık mikroskobu altında tür teşhisleri yapılmıştır. Ayrıca hayvanların cinsiyet, yaş ve ırklarına göre pire enfestasyon durumları istatistiksel olarak incelenmiştir. Bakısı yapılan 142 köpeğin 27 (%19)'ünde pire enfestasyonu belirlenmiş ve bu hayvanlardan toplam 57 adet pire örneği toplanmıştır. Toplanan pirelerin üç türden oluştuğu ve bunların *Ctenocephalides felis* (%73,7), *Ctenocephalides canis* (%22,8) ve *Pulex irritans* (%3,5) olduğu saptanmıştır. Pire enfestasyonu ile cinsiyet, yaş ve ırk arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ($P>0,05$). Sonuç olarak Muğla ili Datça ilçesindeki köpeklerde pire enfestasyonlarının önemli bir problem olduğu ortaya konmuştur. Dermatolojik rahatsızlıklarda bu durumun da göz önünde bulundurulması gerektiği ve bölgedeki hayvanlarda buna karşı mücadele edilmesi tavsiye edilmektedir.

Anahtar kelimeler: Enfestasyon, Köpek, Muğla, Pire,

Flea infestations on owned dogs in Datça district Muğla province of Turkey

Abstract: Fleas are temporary parasites that are well adapted to temperate regions by living on animals blood. Fleas are also vectors for many disease agents and flea infestations are common in dogs. The aim of this study was to determine incidence of flea infestations by considering the flea species involved and associated risk factors in owned dogs in Datça district of Muğla province. For this purpose, 142 dogs of various breeds were examined for the presence of flea infestation in 2018. Collected fleas were identified under the light microscope. In addition, flea infestation status of animals according to sex, age and breed were investigated statistically. Flea infestation was detected in 27 (19%) of the 142 dogs examined and a total of 57 flea samples were collected from these animals. It was determined that the collected fleas belonged to three different species including *Ctenocephalides felis* (73.7%), *Ctenocephalides canis* (22.8%) and *Pulex irritans* (3.5%). There was no statistically significant relationship between flea infestation and gender, age and race ($P> 0.05$). The results of the study indicated that flea infestation was an important problem in dogs in Datça district of Muğla province and this situation should be taken into consideration in dermatological disorders and it was recommended to fight against fleas in animals in the region.

Key words: Dog, Fleas, Infestation, Muğla

Giriş

Pireler, Siphonaptera takımında yer alan ve erişkin dönemleri parazitik yaşama adapte olmuş böceklerdir. Yetişkin dönemlerinde erkek ve dişileri kan emerek beslenirler. Pireler, insan ve diğer hayvanlara; alerjik reaksiyonlara sebep olarak, *Yersinia*, *Rickettsia*, *Bartonella* gibi etkenlere vektörlük yaparak, *Dipyliidium caninum*, *Hymenolepis nana* ve *H.dimunata*'ya arakonaklık yaparak ve kan emerek zarar verirler (Aydın ve Dumanlı 2016). Hem veteriner hekimliğinde hem de beşeri hekimlikte önemli bir parazitozdur (Tüzer ve ark. 1997; Aydın ve ark. 2011).

Bugüne kadar Ceratophylloidea, Leptopsyllidae, Tungidae, Pulicoidea ailesindeki 246 soya ait 2575 farklı pire türü tanımlanmıştır (Marrugal ve ark. 2013). Pireler kozmopolit bir dağılım gösterse de daha çok ılıman iklim kuşağında yoğunlaşmıştır. Pirelerin gelişimi sıcaklık artışıyla paralel olarak hızlanmaktadır. Hava sıcaklığı düştüğü zaman gelişim yavaşlamakta ve/veya durmaktadır. Ancak iç mekân sıcaklığının korunduğu kapalı alanlarda, kış aylarında pireler aktif olabilmektedir (Coşkun ve Çetin 2018). Pire popülasyonu nemli, yağışlı yıllarda artış göstermektedir. Kuru sıcaklığın larvalar üzerine öldürücü etkisi bulunmaktadır (Vuruşaner ve Gülanber 2015).

Yazışma adresi / Correspondence: Mehmet Acıöz, İskele Mah. Ambarcı Cad. Uslu İşhanı No:12, Datça, Muğla, Türkiye
E-posta: mehmet.acioz@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-8888-2794 • ²0000-0002-8325-4887

Dünyada köpeklerde pire enfestasyonun yaygınlığı hakkında yapılan çalışmalarda; İtalya'da %17,9 (Rilavdi ve ark. 2007), Arnavutluk'ta %6,6 (Shukullari ve ark. 2016), İngiltere'de %6,82 (Bond ve ark. 2007) ve Amerika'da %10,2 (Anon 2019) oranında pire enfestasyonu bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise; Hatay'da %78,7 (Akküçük ve ark. 2019), Konya'da %46 (Aydenizöz ve Köse 1997) ve Erzurum'da (Aldemir 2007) %35,42 oranında köpeklerde pire enfestasyonu saptanmıştır.

Kedi ve köpeklerdeki cilt rahatsızlıklarının yarısının pire enfestasyonlarından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Kramer ve Mencke 2001). Bir pire günde 0.03 mm³ kan emebilmektedir. Çok ağır enfestasyonlarda özellikle kedi ve köpeklerde demir eksikliği anemisi görülebilmektedir. Pireler ağız organellerinde bulunan hortumları sayesinde kan emmekte ve ısırıldığı bölgeye antikoagulan madde salgılamaktadır. Pirelerin kan emdikleri bölgeye salgıladıkları maddeler alerjik olup ısırılan bölgede yangı, kızarıklık, eritamöz kabarcık ve kaşıntı plaklarına neden olabilmektedirler. Bazı duyarlı hayvanlarda tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları görülebilmektedir (Gülenber 2017; Kandemir ve ark. 2019; Rust ve Dryden 1997).

Bu çalışma ile Muğla ili Datça ilçesinde sahipli köpeklerde pire enfestasyonunun yaygınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma, Muğla ili Datça ilçesinde Mart- Eylül 2018 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmaya 142 sahipli köpek dahil edilmiştir. Bu çalışma için HADMEK'in 05.06.2009 tarih ve 12 sayılı kararına istinaden etik kurul onayı alınmamıştır. Hayvan sahiplerine çalışmanın amacı anlatılmış ve gerekli onay alınmıştır. Bu hayvanlar öncelikle makroskopik olarak muayene edilmiştir. Etken tespit edilemeyen hayvanların pire tarağı ile detaylıca kontrolleri sağlanmıştır. Toplanan pireler içinde %70 etil alkol bulunan tüplere konulmuştur. Bu pireler, tür tayini için Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi'ne gönderilmiştir. Pirelerden kalıcı preparatlar hazırlanmış (Aydın ve ark. 2011) ve tür tayini ilgili literatürler doğrultusunda Seiler SXS820 binoküler ışık mikroskopu ile yapılmıştır (Dinçer 1971; Gülenber 2017).

Bu çalışmada, elde edilen verilerin istatistiksel analizi için, Statistical Package for the Social Sciences for Windows 20.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, ABD) paket programından yararlanılmıştır. P<0,05 değeri önemli olarak kabul edilmiştir (Özdamar 2001).

Bulgular

Araştırma süresince incelenen 142 köpeğin 27 (%19)'sinde pire enfestasyonu belirlenmiştir. Pire enfestasyonu belirlenen 27 köpekten, 57 pire örneği toplanmıştır. Bunların 42 (%73,7)'si *Ctenocephalides felis*, 13 (%22,8)'ü *C. canis* ve 2 (%3,5)'si *Pulex irritans* olarak teşhis edilmiştir (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3).

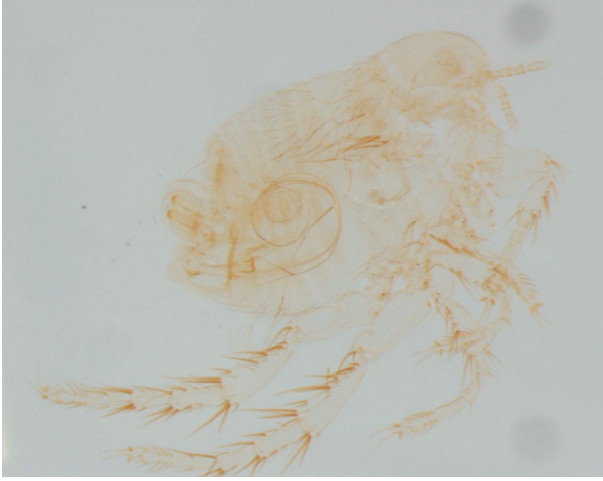


Şekil 1. *C. felis* dişi genel görünümü (X4 büyütmede).



Şekil 2. *C. canis* erkek genel görünümü (x4 büyütmede).

Enfeste hayvanların cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde; dişi köpeklerde %66,7, erkeklerde ise %33,3 oranında pire enfestasyonu belirlenmiştir (Tablo 1). Dişi köpeklerde pire enfestasyonu oranı erkelere oranla yüksek olmasına rağmen, bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 1, x2:504, P>0.05).



Şekil 3. *P. irritans* erkek genel görüntüsü (x4 büyütme).

Pire enfestasyonu, 0-5 yaş grubu köpeklerde %44,4, 6-10 yaş grubunda %37,1 ve 10 yaş üzerindeki grupta ise %18,5 olarak bulunmuştur. Yaş grupları arasında istatistiksel olarak fark saptanamamıştır (Tablo 1, $x^2:0,924$, $P>0.05$).

Tablo 1. Köpeklerde Pire Enfestasyonunun Yaş, Cinsiyet ve Irklara Göre Dağılımı

	İncelenen Köpek Sayısı	Enfeste hayvan sayısı	%	P
Cinsiyet				
Erkek	50	9	33,3	0,504
Dişi	92	18	66,7	
Yaş grupları				
0-5	66	12	44,4	0,924
6-10	48	10	37,1	
11 ↑	28	5	18,5	
İrk				
Alman Kurdu	8	2	7,40	0,996
Av Köpeği	8	2	7,40	
Cani Corsa	4	1	3,70	
Cocker	4	1	3,70	
Çoban Köpeği	26	4	14,8	
Golden	10	2	7,40	
Kangal	12	2	7,40	
Miks	50	8	29,6	
Puanter	6	2	7,40	
Setter	4	1	3,70	
Terrier	10	2	7,40	

Çalışma süresince 11 adet köpek ırkında pire enfestasyonu saptanmıştır. Enfestasyon oranı, en fazla %29,6 ile miks köpek ırklarında, en az ise %3,7 ile Cane Corse, Setter, Cocker ırklarında belirlenmiş olup sonuçlar tablo 2 de ayrıntılı olarak verilmiştir. Pire enfestasyonu oranı ile köpek ırkları arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır (Tablo 1, $x^2:0,996$, $P>0.05$).

Çalışma esnasında Puanter ırkı bir köpekte yoğun pire enfestasyonu belirlenmiştir. Enfeste hayvanda şiddetli kaşıntı saptanmıştır. Karın kısmının detaylı muayenesinde kızarıklık ve epidermiste eritramatoz şişkinlikler belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Bir köpekte yoğun pire enfestasyonu.

Tartışma ve Sonuç

Pirelerin dişi ve erkeleri kan emmek suretiyle insan ve hayvanlarda başta alerji olmak üzere değişik dermatolojik bozukluklara neden olurlar. Bunların yanında, *Dipylidium caninum*, *Hymenolepis nana*, *H.dimunata*, *Dipetalonema reconditum*, *Yersinia pestis*, *Rickettsia typhi*, *Bartonella henselae* gibi birçok patojene vektörlük ve/veya arakonaklık yapabilmektedirler (Abdullah ve ark. 2019). Pire enfestasyonu özellikle yaz aylarında yoğun olarak görülmekte, uygun ısı ve nem koşulları olduğunda kış aylarında da rastlanılabilmektedir (Coşkun ve Çetin 2018).

Türkiye'de köpeklerde pirelerin yaygınlığı hakkında yapılan çalışmalar mevcuttur. Ankara'da yapılan bir çalışmada, 50 kedi, 50 köpek ve 50 tilkiden toplanan 2591 pirenin %31,91'i *P. irritans*, %29,79'u *C. canis* ve %11,92'si ise *C. felis* olarak rapor edilmiştir (Dinçer 1971). İstanbul'da 50 köpekten toplanan 574 pirenin, %94,8'i *C. felis*, %4,88'i *C. canis*

ve %0,35'i *P. irritans* olarak belirlenmiştir (Gülenber 2002). Elazığ'da yapılan bir çalışmada, hayvancılık işletmesinden toplanan 231 pire örneğinin morfolojik teşhislerinde, %34,7'si *C. canis*, %33,3'i *C. felis*, %21,6'sı *P. irritans* ve %10,4'ü ise *Xenopsylla cheopis* olarak teşhis edilmiştir (Aksın ve ark. 2004). Antalya'da yapılan bir çalışmada, 50 köpekten toplanan 152 pirenin 136 (%89,47)'sı *C. felis*, 16 (%10,53)'sı *C. canis* olarak belirlenmiştir (Coşkun ve Çetin 2018). Antakya'da hayvan barınağında yapılan bir çalışmada, %74 oranında *C. canis* rapor edilmiştir (Akküçük ve ark. 2019). Kayseri ilinde yapılan bir yüksek lisans çalışmasında, hayvan barınakları ile bodrum ve sığınaklardan toplanan 100 adet pireden %45'inin *C. canis*, %35'inin *P. irritans*, %20'sinin ise *C. felis* olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızdaki bulgular, İstanbul ve Antalya'daki yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak *C. felis* en fazla saptanan türdür. Ankara'da ki çalışmada *P. irritans* en fazla bulunan tür iken bizim çalışmamızda ise %3,5 oranında bulunmuştur (Atiş 2017). Elazığ, Antalya ve Kayseri'deki çalışmalarda *C. canis* baskın tür iken bu çalışmada %22,8 oranında *C. canis* bulunmuştur.

Pire enfestasyon görülme oranlarında; yıldan yıla, bölgeden bölgeye, mevsimden mevsime farklılıklar olabilmektedir. Hayvanların kırsal veya kentsel alanlarda olmaları, yaşam tarzları (dış ortamla ilişkileri), ev ortamında olup olmamaları, düzenli parazitler mücadelelerin yapılıp yapılmaması, enfestasyon oranında farklılıklara neden olabilmektedir (Ahn ve ark. 2018; Chandra ve ark. 2017; Thomas ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda bulunan veriler yukarıdaki çalışmaları destekler niteliktedir.

İran'da yapılan bir çalışmada 2 yaş atlı köpeklerde %62,7, 2-4 yaş arasında %35, 4 yaş üzeri köpeklerde ise %2,4 oranında pire enfestasyonu belirlenmiş ve yaş grupları arasında farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir (Tavassoli ve ark. 2010). Bu çalışmada ise yukarıdaki çalışmadan farklı olarak her yer yaş grubunda benzer oranda enfestasyon tespit edilmiş olup istatistiksel olarak fark saptanamamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda erkek ve dişi köpeklerde pire enfestasyonu görülme oranı arasında istatistiksel fark saptanamamıştır (Akküçük ve ark. 2019; Mirzaei ve ark. 2016; Tavassoli ve ark. 2010). Bu çalışmada da fark belirlenememiştir ($P > 0.05$).

C. canis, köpeklerde pire alerjik dermatitine neden olmaktadır. Bu hastalık, pirenin tükürük bezinde bulunan alerjik nitelikteki salgılardan kaynaklanmaktadır. Saptanan lezyonlar tek tek ve papüller şeklindedir. Köpeklerde lezyonlar daha çok boyun, karın ve arka bacakların iç kısmında görülmektedir

(Bond 2007). Bu çalışmada da benzer bulgular saptanmıştır.

Sonuç olarak, Muğla ili Datça ilçesinde sahipli köpeklerde %19 oranında pire enfestasyonu belirlenmiştir. En yaygın pire türünün *C. felis* olduğu görülmüştür. Köpeklerde dermatolojik rahatsızlıklarda pire enfestasyonlarının göz önünde bulundurulmasını tavsiye etmekteyiz.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Bu çalışmayı destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarlar olarak herhangi bir çıkara dayalı ilişkimizin olmadığını beyan ederiz.

Kaynaklar

1. Abdullah S, Helps C, Tasker S, Newbury H, Wall R. (2019). Pathogens in fleas collected from cats and dogs: distribution and prevalence in the UK. *Parasites & Vectors*. 12(71), 1-10.
2. Ahn KS, Huh SE, Seol SW, Kim HJ, Suh KH, Shin S. (2018). *Ctenocephalides canis* is the dominant flea species of dogs in the Republic of Korea. *Parasites & Vectors*. 11, 196, 10.1186/s13071-018-2769-9.
3. Akküçük Ş, Kaya ÖM, Karagöz M, Zerek A, Yaman M. (2019). The Louse and Flea Infestations in Cats and Dogs in Antakya Animal Shelter. *Van Veterinary Journal*. 30(1), 37-40.
4. Aksın N, Erdoğan Z, Aksın E. (2004). İki koyun çiftliğinde yaşayan insan ve hayvanlarda bulunan pire türleri ve bunların kontrolleri. *Türkiye Parazit Derg.* 28(3), 146-149.
5. Aldemir OS, (2007). Epidemiological study of ectoparasites in dogs from Erzurum region in Turkey. *Revue Méd. Vét.* 158(03), 148-151.
6. Anonim, (2019). Flea Prevalence in Dogs & Cats, Erişim adresi: <https://todaysveterinarypractice.com/flea-prevalence-in-dogs-cats/>; Erişim tarihi. 02.12.2019.
7. Atiş N, (2017). Kayseri Yöresindeki Hayvan Barınaklarından Toplanmış Pirelerin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonları Yüksek Lisans Tezi, EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
8. Aydenizöz M, Köse M. (1997). Konya Yöresi Köpeklerinde Ektoparazitlerin Yayılışı. *Türkiye Parazit Derg.* 21(3), 321-325.
9. Aydın MF, Balkaya İ, Aktaş M, Dumanlı N. (2011). Erzurum İlinde Üç Kırmızı Tilkiye (*Vulpes vulpes*) Kene (Ixodoidea) ve Pire (Siphonaptera) Türleri. *Türkiye Parazit Derg.* 35(2), 110-113.
10. Aydın MF, Dumanlı N. (2016) Köpek ve Kedilerde Görülen Parazit Hastalıkları-Pire Enfestasyonları. Özcel MA. ed. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları, Türkiye Parazitoloji Derneği, META Basım, İzmir. s.1290-1294.
11. Bond R, Riddle A, Mottram L, Beugnet F, Stevenson R. (2007). Survey of flea infestation in dogs and cats in the United Kingdom during 2005. *Veterinary Record*. 160(5), 503-506.
12. Chandra S, Forsyth M, Lawrence AL, Emery D, Šlapeta J. (2017). Cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from cats and dogs in New Zealand: molecular characterisation, presence of *Rickettsia felis* and *Bartonella clarridgeiae* and comparison with Australia. *Vet Parasitol.* 234(30), 25-30.
13. Coşkun G, Çetin H. (2018). Kış aylarında evcil kedi ve köpeklerdeki pire (Siphonaptera: Pulicidae) enfestasyonları ile ilgili Antalya, Türkiye'den Bir Araştırma. *Türkiye Parazit Derg.* 42(4), 277-280.
14. Dinçer Ş, (1971). Ankara ve Çevresinde Kedi (*Felis domesticus*), Köpek (*Canis familiaris*) ve Tilki (*Vulpes vulpes*)'lerde Bul-

- nan Pire (Siphonaptera)'ler Üzerinde Sistemik Araştırmalar. Doktora Tezi, AÜ Veteriner Fakültesi, Protozooloji, Tıbbi Arthropodoloji ve Paraziter Hastalıklarla Savaş Kürsüsü, Ankara.
15. Gülanber A, (2017). Siphonaptera (Pireler) (Insecta: Siphonapterida) Vektörlükleri ve Mücadelesi. Özbel Y. ed. *Vektör Artropodlar ve Mücadelesi*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:25, İzmir. s.327-360.
 16. Gülanber A, Tüzer E, Keleş V. (2002). Flea infestation of dogs in Istanbul, Turkey. *J Fac Vet Med Univ Istanbul*. 28(1), 219-225.
 17. Kandemir Ç, Taşkın T, Koşum N, Cemal Ü. (2019). Keçi ve Koyun Yetiştiriciliğinde Pirenin Önemi ve Mücadele Şekilleri. *Hayvansal Üretim*, 60(1), 75-88.
 18. Kramer F, Mencke N. (2001). *Flea biology and control*. Berlin: Springer-Verlag GmbH., Berlin Heidelberg New York, USA.
 19. Marrugal A, Callejon R, de Rojas M, Halajian B, Cutillas C. (2013). Morphological, biometrical, and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitol Res*. 112(6), 2289-2298.
 20. Mirzaei M, Khovand H, Akhtardanesh B. (2016). Prevalence of ectoparasites in owned dogs in Kerman city, southeast of Iran. *J Parasit Dis*. 40(2), 454-458.
 21. Özdamar K, (2001). *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi*. Dördüncü baskı. Eskişehir: Kaan Yayınları.
 22. Rinaldi L, Spera G, Musella V, Carbone S, Veneziano V, Lori A, Cringoli G. (2007). A survey of fleas on dogs in southern Italy. *Vet Parasitol*. 148(3-4), 375-8.
 23. Rust MK, Dryden MW. (1997). The Biology, ecology, and management of the cat flea. *Annu Rev Entomol*. 42(1), 451-473.
 24. Shukullari E, Rapti D, Visser M, Pfister K, Rehbein S. (2016). Parasites and vector-borne diseases in client-owned dogs in Albania: Infestation with arthropod ectoparasites. *Parasitol Res*. 116(1), 399-407.
 25. Tavassoli M, Ahmadi A, Imani A, Ahmadiara E, Javadi S, Hadian M. (2010). Survey of Flea Infestation in Dogs in Different Geographical Regions of Iran. *Korean J Parasitol*. 48(2), 145-149.
 26. Thomas JE, Staubus L, Goolsby JL, Reichard MV. (2016). Ectoparasites of free-roaming domestic cats in the central United States. *Vet Parasitol*, 228, 17-22
 27. Tüzer E, Toparlak M, Göksu K. (1997). *Veteriner Entomoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
 28. Vuruşaner C, Gülenber A. (2015). Siphonaptera: (Pireler). Karaer Z, Dumanlı N. eds.(edit.) *Arthropodoloji*. Medisan yayın Serisi, Ankara. 81. Birinci Baskı, p. 265-279. Ankara.



The use of rabbits in studies of immunity and safety of Contagious Ecthyma (CE) vaccine

Veli Gülyaz¹, Fahriye Saraç², Mustafa Hasöksüz³, Serdar Uzar⁴

¹ General Directorate of Food and Control, Ministry of Agriculture and Forestry, Çankaya, Ankara, Turkey

^{2,4} Pendik Veterinary Control Institute, Pendik, Istanbul, Turkey

³ Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Istanbul, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 06.12.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 10.04.2020

Abstract: Contagious ecthyma (CE) is a zoonotic viral infection and common localized cutaneous infection of young sheep and goats caused by a Parapoxvirus with worldwide distribution. The aim of this study was to determine whether rabbits will be used instead of lambs and kids in immune and safety studies after the production of CE vaccine. The titres of Pendik CE pathogen strain isolated from lamb (E(P)CK₄) and attenuated vaccine strain originated from lamb (E(P)CK₂₂) used in the study were TCID₅₀ 10^{6.50} and 10^{7.00}/ml, respectively. In the study, to determine the pathogenicity of CE virus (E(P)CK₄) in rabbits, it was found that CE virus-specific hyperemia, vesicles and pustules were not observed and there was no increase in body temperature, and CE virus was not detected by PCR in the scabs located in the skin of back-waist regions. In the blood sera of rabbits treated with pathogen CE virus and vaccinated with CE vaccine virus, no antibodies were detected against CE virus. In the immunity study in lambs and kids vaccinated with CE vaccine (E(P)CK₂₂), it was found that the vesicles, pustules and scabs appeared on day 3 and the lesions healed on the 15th day seen that CE vaccine virus protects lambs and kids against pathogen CE (E(P)CK₄) strain.

Key words: Contagious ecthyma, immunity, kid, lamb, rabbit, vaccine.

Contagious Ektima (CE) aşısının bağışıklık ve zararsızlık çalışmalarında tavşanların kullanılması

Özet: Contagious Ektima (CE) hastalığı, genç koyun ve oğlaklarda lokalize kutanöz enfeksiyonlara sebebiyet veren, dünyada yaygın olarak bulunan Parapoxvirusların neden olduğu zoonotik viral bir enfeksiyondur. Bu çalışmanın amacı, CE aşısının üretilmesinden sonra bağışıklık ve güvenlik çalışmalarında kuzu ve oğlakların yerine tavşan kullanmaktır. Çalışmada kullanılan kuzulardan izole edilmiş patojen Pendik CE suşu (E(P)CK₄) ve attenüe olan (E(P)CK₂₂) aşı suşunun titrelerinin sırasıyla DKID₅₀ 10^{6.50} ve 10^{7.00}/ml olduğu belirlendi. Tavşanlarda CE virusunun (E(P)CK₄) patojenitesini belirleme çalışmasında, CE virusuna özgü hiperemi, veziküller ve püstüller gözlemlenmedi, vücut sıcaklıklarında artış olmadı ve bel bölgesinde bulunan yara kabuklarında CE virusu PCR ile tespit edilmedi. Patojen CE virusu uygulanan ve CE aşı virusu ile aşıl原因an tavşanların kan serumlarında, CE virusuna karşı antikor tespit edilmedi. CE aşısı (E (P) CK₂₂) ile aşıl原因mış kuzu ve oğlaklarda yapılan bağışıklık çalışmasında, skarifikasyon yapılan deri bölgesinde veziküllerin, püstüllerin ve kabukların 3. günde ortaya çıktığı ve lezyonların 15. günde iyileştiği tespit edildi. CE aşı virusunun kuzu ve oğlakları patojen CE (E (P) CK₄) virusuna karşı koruduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Aşı, bağışıklık, contagious ektima, kuzu, oğlak, tavşan.

Introduction

Parapoxvirus infections (PPV) occur in sheep, goats, deer and humans also known as contagious ecthyma, orf, sore mouth, scabby mouth, contagious pustular dermatitis, dermatitis pustulosa of small ruminants, ulcerative dermatosis of sheep, lip and leg ulceration, veneral balanoposthitis and vulvitis, lippengrind infection disease (Rabinson and Balassu, 1981; Mc keever et al., 1988; Nourani H and Maleki M, 2006). Orf virus (ORFV) is a parapoxvirus (subfamily Chordopoxvirinae, family Poxviridae) with ovoid-shaped virions of ~ 260 by 160 nm and

a linear double-stranded DNA genome of 134-139 kb.(Da Costa et al. 2019). Small ruminants, wild ruminants, ibex, llama are susceptible to CE virus. The disease has a zoonotic potential particularly for those who are in close contact with animals such as veterinarians, farmers, animal attendants, and visitors (Bala et al. 2018).

The disease has been considered benign, the lesions are painful and can lead to anorexia and starvation. The outbreaks generate economic losses associated with a growth delay and deterioration of the animal's body condition (Nourani and Maleki,

Yazışma adresi / Correspondence: Doç. Dr. Veli Gülyaz, Üniversiteler Mah. Dumlupınar Bulvarı, No: 161, Yeni Bina Çankaya/ANKARA E-mail: veligulyaz@yahoo.co.uk; veli.gulyaz@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-0077-6071 • ²0000-0001-5854-1676 • ³0000-0003-3185-6453 • ⁴0000-0002-0120-7148

2006; Peralta et al. 2018). In case of secondary infections with other viruses and bacteria, the mortality rate increase from 10 to 20 % (Sowmiya et al. 2018). CE virus is transmitted through direct contact with infected animals and the virus which is highly resistant and can survive in the environment for more than one year (Sadiq et al, 2017; Al Saad et al. 2017; Tedla et al. 2018). In case of secondary infections, mortality rate is between 20-50%. There are genetic variations between CE goat and lamb field strain (Lin et al. 2015).

Within the scope of the fight against CE disease, newly purchased animals should be kept under quarantine before being brought to the farm. Animals should be disease free in clinical examination. Animals should be vaccinated with CE vaccines in the fight against CE disease. There are some kind of vaccine such as live attenuated in tissue culture and not fully attenuated and also produced in sheep are used for the prevention of CE disease, (Pye D, 1990; Musser et al. 2012).

The aim of this project was to investigate the possibility of using rabbits instead of lambs and kids in immunity and harmlessness studies of post-production CE vaccine.

Materials and Methods

Contagious ecthyma (CE) virus strains: CE vaccine strain (E(P)CK₂₂) and pathogen strain (E(P)CK₄) were obtained from Pendik Veterinary Control Institute.

Cell culture: Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) cell culture used for the production of viruses and serum neutralization tests were obtained from the cell culture centre of The Foot and Mouth Disease Institute. In order to propagate MDBK cells, fetal calf serum inactivated at 56°C for 30 minutes (BIOCHROM-cat no:S-0125) was added to DMEM/Ham's-F-12 (BIOCHROM-cat no:F 4815) medium as 10% and 2% (Burlison et al. 1992).

DNA isolation and cleaning kits: DNA isolation of CE virus was performed with the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, cat no: 69506) and in accordance with the protocols specified in the kit. The PCR Purification kit (Min Elute®, QIAGEN, cat no. 28004) was used for clearance of pre-sequence PCR products according to the protocols specified by the company (Chan et al. 2007).

Primers: For the identification of the CE vaccine and field (challande) virus, sequence primers belonging to the CE virus were selected from the reference genes in the NCBI gene bank (Table 1) and designed for DNA sequencing of the entire B2L gene using the Prim Select mode of the DNASTAR gene analysis program (Nettleton et al. 1996).

Table 1: Primers used for DNA sequencing of the B2L gene.

Primary name	Sense	Primary sequencing (5-3)	MER	Product length
B2LF1	+	AGA ACT CGC CCG CCT GCT AAA AGA	24	660 bp
B2LR2	-	CCC CGG AGT GGT CGA GGT GGA AGT	24	
B2LF2	+	CAA GCA CCT GGC CTG GGA CCT CAT	24	713 bp
B2LR3	-	GCT TGC GGG CGT TCG GAC CTT C	22	
B2LF3	+	GCA CCG CAT CGA GAA CGC CAA GAA	24	574 bp
B2LR4	-	AGG GAC GCC GCC GCA CAC C	19	
B2LF4	+	GAA GAA CTC GCC CGC CTG CTA AAA	24	346 bp
B2LR5	-	GTC CGC GTC CTT GTC CTT GCT CTG	24	

Propagation of cells: MDBK cell culture was produced with DMEM/Ham's-F-12 medium containing 10 % FCS in 25 cm² flask at 37°C and 5 % CO₂ as monolayer.

Propagation of pathogen CE virus (E(P)CK₄): 100µl CE virus at 4th passage level was inoculated in to the monolayer MDBK cell culture produced in 75 cm² flask and was incubated at 37°C and 5 % CO₂. Cell culture was observed daily for CPE formation

and at 90 % CPE formation, the flasks were frozen and thawed at -70°C. The cell debris was removed by centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes and stored at -70°C until use (Burlison et al. 1992).

Detection of infective titer of pathogen CE virus: Microvirus titration test was performed to determine the TCID₅₀/ml of the produced CE virus. Ten-fold dilutions of the CE virus were made with PBS from log₁₀ 10-1 to 10-6. The 100 µl of each dilution was

placed in four wells of 96-well plate. 50 µl of MDBK cell culture (3-5x10⁵ cells/ml) was added to all dilutions. 100 µl of medium and 50 µl of cell suspension were placed in the last four wells of the plate for cell control. The plate was incubated at 37°C with 5% CO₂ for 10 days and checked daily. Formation of CPE due to virus growth was observed. TCID₅₀ values of the produced virus were determined by the Spermen-Kaerber method (Ergin and Köklü 1974; Nashiruddullah et al. 2016).

Pathogenicity study with pathogen CE virus (E(P)CK₄) in rabbits, lambs, and kids: 1 ml of CE virus field isolate was taken and diluted with dilution liquid containing 9 ml of 50% glycerin+50% PBS used for this purpose.

Pathogenicity study in rabbits: For this purpose, 10 rabbits were shaved at the waist skin and CE virus field isolates were inoculated 8 rabbits by scarification method (Picture 1).



Picture 1. Skin appearance of rabbits after challenge

Pathogenicity study in lambs and kids: Six lambs and kids were shaved on the inside of the hind legs and 4 lambs and 4 kids were given CE virus field isolates by scarification method (Yirrell et al. 1989; Housawi et al. 1993; Zamri et al. 1994). As a control group, two rabbits, 2 kids and 2 lambs were inoculated only with PBS + glycerin mixture by the scarification method.

Vaccination of rabbits, lambs and kids with CE vaccine: Before the study, blood samples were taken from 22 kids aged 2-3 months which had no CE disease in the previous years and did not show any signs of CE disease and they were checked by serum neutralization test (SNT) for carrying antibodies against CE virus. The kids were quarantined for 10 days before being tested. Their daily body temperature was recorded. Kids were observed during the quarantine for clinical signs of CE and other diseases (Buddle and Pulford, 1984; Pye, 1990; Musser et al. 2012).

Vaccination of rabbits: The CE vaccine was diluted with 40 ml of PBS + glycerin diluent. The waist area of 8 rabbits was shaved and the skin was scarified diagonally by 3 lines of 0.5-1 cm diameter with a needle deep enough to cross the first layer of the skin. 3 drops of diluted CE vaccine were applied to the scarified areas and waited for 3-4 seconds to complete the vaccination. Two rabbits were used as control (mock) by dropping PBS + glycerin mixture to the scarified skin.

Vaccination of lambs and kids: Lyophilized CE vaccine was diluted with 40 ml of PBS + glycerin diluent. The shaved skin area on the inside of the hind legs of 4 lambs and 4 kids was scarified diagonally by 3 lines of 0.5-1 cm diameter with a needle deep enough to cross the first layer of the skin and 3 drops of diluted CE vaccine were applied to the scarified areas. As for 2 lambs and 2 kids (Mock) used as controls in challenge studies, 3 drops of PBS + glycerin mixture were applied to the scarified areas and were waited for 3-4 seconds before releasing the animals.

Immune controls in vaccinated rabbits, lambs and kids: Body temperatures of animals vaccinated with CE vaccine were measured for 15 days. The vaccination site was checked for signs of necrosis, hyperemia and CE disease.

Determination of antibody titers against CE virus in lambs and kids: Thirty (30) days after the CE vaccination by scarification method, blood was taken from vaccinated lambs, goats, and rabbits, as well as the controls, to investigate antibody titers against CE virus (Mc Keever et al. 1987).

Serum Neutralization test (SNT): In order to determine the antibody titer levels against CE virus by SNT, 50 µl of DMEM /F12 Ham's medium was placed in all wells of 96-well plates. 50 µl of the blood serum was placed in the first two wells of the plate, and 50 µl of the first wells were transferred to the lower wells to make the two-fold dilutions of the serum. Standard CE virus (E(P)CK₄) strain in 50 µl of 100 TCID₅₀ titer was added to two-fold dilution of the serum samples in the wells and let them to neutralize for one hour at 37°C. At the end of the incubation period, 50 µl of MDBK cell culture was added to all wells and incubated in 5% CO₂ medium for 10 days at 37°C. Cells were checked daily for CPE formation (Nashiruddullah et al. 2016).

Determination of immunity to CE virus after vaccination in rabbits, lambs and kids: 10 ml of pathogen CE strain was diluted with 10 ml of PBS + glycerin diluent. Thirty days after the CE vaccina-

tion, 8 vaccinated rabbits from their back, 4 vaccinated lambs, 4 vaccinated kids, and 2 for each of Mock rabbits, lambs and kids were challenged with 3 drops at their previously shaved and scarified skin. Body temperature of rabbits, lambs and kids were measured daily for 15 days. Following the challenge, control animals challenged simultaneously with vaccinated lambs were examined for vesicles, pustules and later crustation in the scarification areas of their skins (Buddle and Pulford, 1984; Pye, 1990; Musser et al. 2012).

Investigation of CE virus by PCR in skin lesions after scarification in rabbits.

DNA isolation: Following the isolation of reference CE vaccine strain E(P)CK₅ in the cell culture as positive control and the inoculation to rabbits, DNA isolation from crustation on the skin was performed using High pure viral nucleic acid kit (Roche, cat no: 11796823001) and in accordance with the protocols specified in the kit. Briefly, 200 µl of cell culture supernatant, 200 µl binding buffer and 40 µl of Proteinase K mixture were incubated for 10 min at 70°C (rabbit's skin scrapings were kept in 200 µl of binding buffer for 2 hours at 70°C, then the protocol was continued), 100 µl isopropanol was added, and the whole was transferred to filtered columns. It was centrifuged at 8000 g for 1 minute, 500 µl inhibitor removal solution was added to the column and it was centrifuged again in the same way. 500 µl of washing solution was added and centrifuged, and finally, 200 µl of elution solution was added to the column and centrifuged in the same way to obtain DNA samples and stored at -20°C until use. The primers used in the study (Table 1) were selected and optimized from the B2L gene of CE virus.

PCR: In our PCR studies for isolation of target regions, 5 µl template DNA, 10 µl 10X buffer, 1 µl dNTP (0.8µM), 1 µl primer F and primer R (20µmol), 0.5 µl Taq DNA Polymerase (2.5U), and ddH₂O was added to obtain a total volume of 50 µl. Following 3 minutes at 94°C; 1 minute at 94°C, 45 seconds at 53°C, and 1 minute at 72°C for 30 cycles; and finally 7 minutes at 72°C in the thermal cycler, the PCR products were electrophoresed below 100V in 2% agarose gel and DNA bands were observed in UV medium.

Results

The pathogen CE virus (E(P)CK₄) titer TCID₅₀ was found to be 10^{7.0}/ml, while the vaccine virus titer was TCID₅₀ 10^{6.5}/ml. No antibodies against CE virus were

detected in the blood sera taken from the lambs and kids before the inoculation.

Pathogenicity study with pathogen CE virus in rabbits, lambs, and kids:

Pathogenicity study with pathogen CE virus in rabbits (Group 1): No hyperemia, pustule and crustation was detected due to CE virus growth in scarified skin areas after 15 days of clinical observation of 8 rabbits shaved at the back-waist area and scarified to administer CE virus field isolate and 2 control (mock) rabbits. In addition, there was no increase in body temperature for 15 days and no antibodies against CE virus were detected in blood sera.

Pathogenicity study with CE virus in lambs and kids (Group 2): Four lambs and 4 kids eprüvated with CE virus field isolates were detected not to have increase in body temperature (38.5-39.5°C) and to develop hyperemia, vesicles and pustules in scarified skin areas as from 2-3 days following the administration in subsequent days (Picture 2, Picture 3). The lesions in lambs and kids were detected to heal in days 32-37. It was observed that the thin and small scabs were shed in 4-6 days as from day 2 and no lesion was remained on the scarified skin in lambs and kids used in two for each.

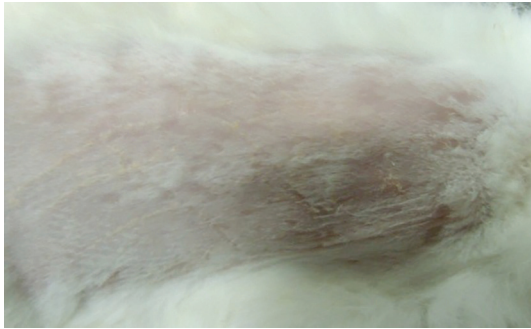


Picture 2. Skin lesions in lambs eprüvated with pathogen CE virus



Picture 3. Skin lesions in kids eprüvated with pathogen CE virus

Determination of immunity to CE virus after vaccination in rabbits. Eight rabbits vaccinated with CE vaccine and 2 Mock rabbits were detected not to have increase in body temperature for 15 days following the challenge after scarification at the waist-back region. No antibodies against CE virus were detected in the blood sera of rabbits. No vesicles, pustules and later crustation were detected in the scarification areas on the skins of control rabbits applied simultaneously with rabbits vaccinated with CE vaccine (Picture 4).



Picture 4. Skin appearance of rabbits eprüvated after CE vaccination

Determination of immunity against CE virus after vaccination in kids and lambs: Following the challenge of vaccinated kids and lambs with pathogen CE virus (E(P)CK₄), they were detected not to have increase in their body temperature (38.1-39.2°C). Hyperemia was observed in scarified skin areas of kids and lambs as from the second day of the challenge and vesicles and pustules developed in subsequent days but healed in 9-11 days (Picture 5) (Picture 6). In 2 challenged control kids and lambs, skin lesions started to heal on day 28 and the scabs were shed on day 35. In negative control kids, it was observed that scabs occurred in day 2 and these thin and small scabs were shed in day 4 and no lesion was remained on the scarified skin

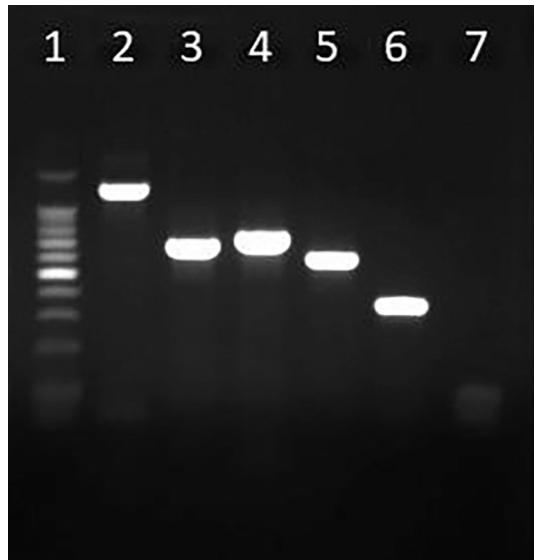


Picture 5. Skin appearance following eprüvated with CE field isolates in lambs vaccinated with CE vaccine



Picture 6. Skin appearance following eprüvated with CE field isolates in kids vaccinated with CE vaccine

Investigation of CE virus by PCR in scabs on the scarified skin after challenge in rabbits: No CE virus was detected by PCR test in the samples taken from the scabs on the skin of the rabbits after scarification with both CE field isolates and CE vaccine strain (Picture 7). The PCR products used in Samples 2-6 are PCR products of DNAs obtained from the E(P)CK₄ strain of CE virus (CEV). All primers had negative results with DNA isolated from rabbit scabs (Picture 7).



Picture 7. PCR results from rabbit scabs and different primers of the B2L gene region of the reference CEV strain

1: DNA ladder (Promega 100 bp), 2: CEV (Primers OVB2LF and OVB2LR, 1206 bp), 3: CEV (Primers B2LF1 and B2LR2, 660 bp), 4: CEV (Primers B2LF2 and B2LR3, 713 bp), 5: CEV (Primers B2LF3 and B2LR4, 574 bp), 6: CEV (Primers B2LF4 and B2LR5, 346 bp), 7: Rabbit crustation sample (primers OVB2LF and OVB2LR)

Discussion

Contagious ecthyma (CE) is a zoonotic viral infection of sheep and goats and live attenuated vaccines are used to protect animals from CE disease. This study was conducted to determine the usability of rabbits in the immunization studies of CE vaccine produced by public and private companies in our country for lambs and kids by conducting the immunization and harmlessness studies in rabbits together with lambs and kids.

In a study on the experimental infection of CE virus in rabbits and mice carried out by Cargnelutti et al. (2011) reported that ears, skin and labial commissure in rabbits, ears in mouse and labial commissure and inner hind legs in lambs were intradermally inoculated with $10^{8.5}$ TCID₅₀/ml of CE strain Iowa-82; animals were observed clinically, virologically, and pathologically; hyperemia, macule papules, vesicles, pustules and scabs occurred in 3-4 days and local lesions ended in 3-10 days; histological examination revealed focal proliferative dermatitis and balloon degeneration in keratinocytes; virus was recovered from lesions between days 2 and 14 pi.; intrastoplasmic inclusions were detected in eosinophils; similar lesions were detected in 5 out of 10 mice; clinical and histopathological lesions due to characteristic CE infection occurred in all lambs; and all rabbits were seropositive with ELISA but no neutralizing antibodies were detected on day 28. In our study conducted in rabbits, no hyperemia, macule papules, vesicles and pustules developed and no genomic material belonging to the CE virus was detected in scabs caused by scarification on the skin at the waist region of rabbits in pathogenicity tests performed with both pathogen and attenuated CE vaccine virus. Based on this data we can say that CE virus (E(P)CK₄) and (E(P)CK₂₂) could not adapt and grow in the skin cells of rabbits due to the application of scarification method administered to the scarified skin by dropping. In the study conducted by Cargnelutti et al. (2011), the pathogen CE virus isolate was directly injected intradermally into the skin and virus growth and skin lesions were observed on the skin of rabbits. In addition, the field virus used in our study is likely to be less pathogenic than the CE virus used by Cargnelutti (2011). It was concluded that it would be appropriate to repeat this study in rabbits by intradermal route reported by Cargnelutti et al. (2011).

Acknowledgement: This project was supported by the Scientific and Technological Research Coun-

cil of Turkey (TUBITAK) (Project number is TOVAG-113O190).

Author Contributions: VG and MH designed the experiments, VG, MH, SU and FS carried out the experiments, VG and MH analysed the data and wrote the paper.

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

Animal and Human Rights Statement This study was conducted under the supervision of the general directorate of agricultural research and policies of the ministry of agriculture and forestry. In addition, permission (85/09) was obtained from the ethics committee of experimental animals of Pendik Veterinary Control Institute.

References

1. Al Saad KM, Thweni HT, Abdali DA, Tarik AS. (2017). Clinical and Diagnostic Studies of Contagious Ecthyma (ORF) In Sheep. *IOSR*. 10(7): 64-69.
2. Bala JA, Balakrishnan KN, Abdullah AA, Adamu L, Noorzahari MSB, May LK, Mangga HK, Ghazali MT, Mohamed RB, Haron AW, Noordin MM, Lila MAM. (2019). An association of orf virus infection among sheep and goats with herd health programme in Terengganu state, eastern region of the peninsular Malaysia. *BMC Veterinary Research*. 15(250): 2-15.
3. Buddle BM and Pulford HD. (1984). Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet Microbiol*, 9: 515-522.
4. Burleson FG, Chambers TM and Wiedbrauk DL. (1992). *Virologia Laboratory Manual* 1. Ed. Academic Press., California, USA. pp:20-61.
5. Cargnelutti JF, Masuda EK, M. Martins, Diel DG, Rock DL, Weiblen R, Flores EF. (2011). Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice. *Microb Pathog*. 50(1): 56-62.
6. Chan KW, Lin JW, Lee SH, Liao CJ, Tsai MC, Hsu WL, Wong ML and Shih HC. (2007). Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan. *Virus Genes*. 35(3): 705-12.
7. Da Costa RA, Cargnelutti JF, Schild CO, Flores EF, Riet-Correa F, Giannitti F. (2019). Outbreak of contagious ecthyma caused by orf virus (parapoxvirus ovis) in a vaccinated sheep flock in Uruguay. *Braz J Microbiol*. 50(2): 565-569.
8. Ergin H and Köklü A. (1974). Investigation of passage and antigenic properties of ecthyma virus in tissue cultures. *Pendik Vet. Microbiology*. 6(2):12-20.
9. Housawi FMT, Abu Elzein EME, Gameel AA, Ala Faleg AI. (1993). A close comparative study on the response of sheep and goats to experimental orf infection. *J Vet Med*. 40: 272-282.
10. Lin FY, Tseng YY, Chan KW, Kuo S-T, Yang CH, Wang CY, Takasu M, Hsu WL, Wong ML. (2015). Suppression of influenza virus infection by the orf virus isolated in Taiwan. *J Vet Med Sci*. 77(9): 1055-1062.
11. Mazur C, Ferreira II, Rangel Filko FB, Galler R. (2000). Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet Microbiol*. 73: 253-259.
12. Mc Keever DJ, Reid HW, Ingus NF, Herring AJ. (1987). A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody

- response of sheep to orf virus infection. *Veterinary Microbiol.* 15: 229-241.
13. Mc Keever DJ, Jan Kinson DM, Hutchison G, Reid HW. (1988). Studies of the Pathogenesis of Orf Virus Infection in Sheep. *J Comp Pathol.* 99: 317-328.
 14. Musser JMB, Waldron DF, Charles A, Taylor CA. (2012). Evaluation of homologous and heterologous protection induced by a virulent field strain of orf virus and an orf vaccine in goats. *Am J Vet Res.* 73(1): 86-90.
 15. Nashiruddullah N, Pathak DC, Barman NN, Ara AJ, Gitika R, Kumar SR, Probodh B, Sultana BS. (2016). Evaluation of orf virus (ORFV) isolation in continuous lamb testis cells (OA3. Ts) and development of a co-culture method with infected cells to increase infectivity. *Indian J Anim Res.* 50(6): 951-957.
 16. Nettleton PF, Brebner J, Pow I, Gilray JA, Bell GD, Reid HW. (1996). Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *The Vet Record.* 138: 184-186.
 17. Nourani H and Maleki M. (2006). Contagious ecthyma: case report and review. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 9(13): 2543-2545.
 18. Peralta A, Robles CA, Micheluod JF, Rossanigo CE, Martinez A, Carosio, König GA. (2018). Phylogenetic analysis of orf viruses from five contagious ecthyma outbreaks in argentinian goats. *Front Vet Sci.* 5(6): 134.
 19. Pye D, 1990. Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus. *Aust Vet J.* 67: 182-183.
 20. Rabinson AJ and Balassu TC. (1981). Contagious pustular dermatitis (Orf). *The Vet Bull.* 51(10): 771-782.
 21. Sadiq MA, Abba Y, Jesse FFA, Chung ELT, Bitrus AA, Abdullah AA, Balakrishnan KN, Bala JA, Lila MAM. (2017). Severe persistent case of contagious ecthyma (orf) in goats. *Journal of Animal Health and Production.* 5(1): 24-28.
 22. Sowmiya PV, K. Ramya K, Sukmar K, Madheswaran R. (2018). Molecular Confirmation of Contagious Ecthyma Among Goats in Dharmapuri District of Tamil Nadu, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 7(6): 60-65.
 23. Tedla M, Berhan N, Molla W, Temesgen W, Alemu S. (2018). Molecular identification and investigations of contagious ecthyma (Orf virus) in small ruminants. North west Ethiopia, *BMC Veterinary Research.* 14:13.
 24. Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Idowie SEM. (1989). Immune responses of lambs to experimental infection with orf virus. *Vet Immunol immunopathol.* 22(4): 321-322.
 25. Zamri SM, Rashidah I, AL-Ajeeli KSA. (1994). Experimental cross-infection of sheep and goats with different isolates of contagious ecthyma virus. *Aust Vet J.* 71(7): 218-220.



Malignant Catarrhal Fever caused by Ovine Herpesvirus-2 in a cow

Hamdi Avcı¹, Emrah İpek², Ali Rıza Babaoğlu³, Erkmen Tuğrul Epikmen⁴, Ahmet Aydoğan⁵

^{1,2,4} Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

³ Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Van Yüzüncüyıl University, Van, Turkey

⁵ Department of Pathology, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Çukurova University, Adana, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 06.04.2020, Kabul tarihi / Accepted: 12.05.2020

Abstract: Malignant catarrhal fever (MCF) has been defined as a viral disease of domestic cattle and wild ruminants. We report a case of MCF caused by Ovine herpesvirus-2 (OvHV-2) in a 4-year-old female Holstein cow. Macroscopically, eyelids and conjunctiva were edematous and all superficial and, visceral lymph nodes were swollen. Microscopic examination showed that fibrinoid necrotic vasculitis in all tissues and organs; inflammatory changes in the vessel walls of the brain (pons, cerebrum and meninges); ulcerative changes in the oral mucosa; mild inflammatory cell infiltrations around the glomeruli and interstitium in the cortex of the kidney; widespread edema between the muscle bundles in the heart. PCR was performed to determine the presence of Ovine herpesvirus-2 nucleic acids and 386 bp product was obtained by primer sequences that replicated the pol gene region of OvHV-2. This PCR finding confirmed our diagnosis as sheep-associated MCF (SA-MCF).

Key words: Malignant catarrhal fever, Ovine herpesvirus-2, pathology, PCR

Bir inekte Ovine Herpesvirüs-2'nin neden olduğu Sığır Gangrenli Nezlesi olgusu

Özet: Sığır gangrenli nezlesi (SGN) (malign kataral ateş), evcil sığır ve yabani geviş getirenlerin önemli viral bir hastalığıdır. Sunulan olguda, 4 yaşlı Holştayn ırkı bir inekte Ovine herpesvirüs-2'nin (OvHV-2) neden olduğu SGN enfeksiyonu patolojik ve PCR bulgularıyla birlikte tanımlanmıştır. Makroskopik olarak, göz kapakları ve konjunktiva ödemli; tüm viseral ve yüzeysel lenf düğümleri şişkindi. Mikroskopik incelemede, tüm doku ve organlarda fibrinoid nekrotik vaskülit, beyin damar duvarlarında yangısal değişiklikler (pons, serebrum ve meninkler), oral mukozada ülseratif değişiklikler, böbreğin korteksinde glomerüllerin çevresinde interstisyumda hafif yangısal hücre infiltrasyonları ve kalpteki kas demetleri arasında yaygın ödem görüldü. OvHV-2 nükleik asitlerinin varlığını belirlemek amacıyla PCR yöntemi uygulandı ve 386 bp ürünü, OvHV-2'nin pol gen bölgesini çoğaltan primer dizinleri ile elde edildi. Bu bulgular ile sunulan olguda koyunla ilişkili SGN tanısı doğrulandı.

Anahtar kelimeler: Ovine herpesvirüs-2, patoloji, PCR, sığır gangrenli nezlesi

Introduction

Malignant catarrhal fever (MCF) is a viral disease with a high mortality rate in cattle and other ruminants. The disease is usually sporadic, but occasionally causes outbreaks. Epidemiologically, two forms of the disease have been described. The first is the form associated with antelope named as Wildebeest-associated MCF (WA-MCF). The other form of the disease is thought to be sheep related and named as sheep-associated MCF (SA-MCF) (Dabak and Bulut 2003; Bedelian et al. 2007; Russell et al. 2009).

MCF is caused by many viruses in the Macavirus genus of the gammaherpesvirinae subfamily. There are at least 10 viruses in this genus; alcelaphine herpesvirus-1 (A1HV-1) and ovine herpesvirus-2 (OvHV-2) are among them which cause the

disease. WA-MCF is formed by A1HV-1 and SA-MCF is formed by OvHV-2 (Crawford et al. 2002; Li et al. 2005; Russell et al. 2009). SA-MCF has been reported from almost every region of the world such as North and South America, Europe, Middle East and New Zealand (Russell et al. 2009).

The aim of this case report was to analyze the clinicopathologic and molecular features of a case from an outbreak of MCF in a cattle farm in Turkey.

Materials and Methods

Systemic necropsy of a 4-year-old female Holstein cow which was brought to the Department of Pathology with a history of loss of appetite, stagnation, mouth and nose discharge, high fever, corneal dullness and redness (hyperemia-erythema) in conjunctiva was performed. In anamnesis; in a herd of

Yazışma adresi / Correspondence: Ahmet Aydoğan, Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Balcalı Kampüsü Sarıçam-Adana, E-posta: aaydogan79@gmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-7776-5373 • ²0000-0002-5247-5222 • ³0000-0001-8023-3442
⁴0000-0003-2641-2321 • ⁵0000-0003-2504-8150

120 animals, four animals were reported to have died shortly after showing similar clinical symptoms. It is also reported that there is a flock of sheep in the immediate vicinity of near of this farm.

Following necropsy, tissue samples were fixed in 10% buffered formalin solution, blocked in paraffin, sectioned at 4-5 µm, stained with hematoxylin and eosin (H&E) and evaluated under light microscope for microscopic examination (Olympus BX51).

Tissue samples (kidney, lymph nodes, and brain) taken for virologic examination were tested by PCR method to investigate the presence of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1), and Ovine Herpesvirus-2 (OvHV-2) nucleic acids. For this purpose; tissue samples were homogenized; DNA and RNA isolations were performed in accordance with following the procedure reported with the Quick-DNATM Universal kit (ZYMO Research, USA) and Quick-RNATM Mini Prep (ZYMO Research, USA) commercial kit, respectively. Primer sequences, product sizes and references used for PCR are presented in Table 1. The conver-

sion of viral RNAs obtained to investigate the presence of BVDV in nucleic acid was performed into complementary DNA (cDNA). For this purpose, the Revertaid First Strand cDNA kit (Fermentas, Lithuania) was used in accordance with the procedure. The obtained cDNAs were stored at -20 °C for use in conventional PCR. PCR was performed to determine the presence of BVDV, BoHV-1 and OvHV-2 nucleic acids. PCR was performed in a total reaction volume of 25 µl containing 2.5 µl of 10 x Hot Start Taq Buffer, 0.5 µl of Hot Start Taq DNA polymerase (5U/µl), 2.4 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl of each primers at a concentration of 10 pmol/µl and 3 µl of template DNA or cDNA. The amplification conditions for detection of BVDV, BoHV-1 and OvHV-2 nucleic acids used were 15 min at 95 °C; followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 1 min at 72 °C and final extension step in 72 °C for 10min. PCR products were loaded onto 1,5% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide (Sigma, USA). The amplicons, which were positively detected in conventional PCR in terms of OvHV-2 nucleic acid, were loaded into a 1% gel to evaluate gel images.

Table 1. Primer sequences, product sizes and references used for PCR.

Gene	Primer sequences	Product length (bp)	Reference
OvHV-2 (Pol gene)	F: 5'-GGC(CT)CA(CT)AA(CT)CTATGCTACTCCAC-3' R: 5'-ATT (AG)TCCACAAACTGTTTTGT-3'	386	Flach et al. 2002
BoHV-1	(PF: 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3') (PR: 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3')	572	Esteves et al. 2008
BVDV	F: P1 : 98-(5'-GAGGCTAGCCATGCCCTTAGT-3')-119 R: P3:371-(TCAACTCCATGTGCCATGTACAGCA-3')-395	297	Boye et al. 1991

Results

Macroscopically, the body condition of the cow was cachectic. Eyelids and conjunctiva were edematous and conjunctival mucosa was congested. The opacity that started from the periphery of the eye cornea to the center was quite prominent. On the inner face of the lower lip and gingiva, numerous ulcer areas with an irregularly shaped hemorrhagic surface were covered with a dirty yellowish exudate. All superficial and visceral lymph nodes were large and edematous; their cross-sectional faces were generally congested with occasional hemorrhagic areas. Pharyngeal and laryngeal mucosa was edematous and hyperemic. The spleen was slightly enlarged and prominent lymph follicles were observed on the cross-sectional face of the spleen. Abomasum wall was edematous and ulcers with multiple irregular shaped hemorrhages were observed on the surface of abomasum mucosa. The kidney was multicolored, and there was a multifocal distribution of gray-white

colored foci of 2-4 mm in diameter, separated from the surface by hemorrhagic zone.

The most severe prominent microscopic finding was fibrinoid necrotic vasculitis in all organs, especially in the liver, kidney and central nervous system. In some vessels, endothelial cells were swollen and hyperplastic in appearance, and thrombi of varying size were seen in the lumens of some vessels. Ulcerative changes in the oral mucosa and fibrous connective tissue proliferations in areas close to these ulcers were evident (Figure 1). Severe necrotic changes in the parenchymal tissue were evident in areas where vascular lesions. In addition to vascular lesions in the liver, mononuclear cell infiltrations in the centrilobular area, dilatation of sinusoids, diffuse degeneration in hepatocytes, focal hemorrhages and necrosis were observed. There was widespread edema and hemorrhages between the muscle bundles in the heart. Edema was usually associated with hemorrhage and eosinophilic

fibrillary material (fibrin). Inflammatory cell infiltration and hyaline degeneration in muscle fibers near some areas of hemorrhage were detected. The most prominent changes in lymph nodes were dense lymphoid cell hyperplasia in the cortical and paracortical regions. Cortical and medullary sinuses were filled with lymphoid cells and macrophages. Thrombi were observed in some lesioned vessels. Also, areas of focal hemorrhage and necrosis were noted. In the spleen, lymphatic follicles were seen with marked hyperplasia and extensive hemorrhagic areas. Hemosiderin pigment was found in the cytoplasm of macrophages in the hemorrhagic areas.

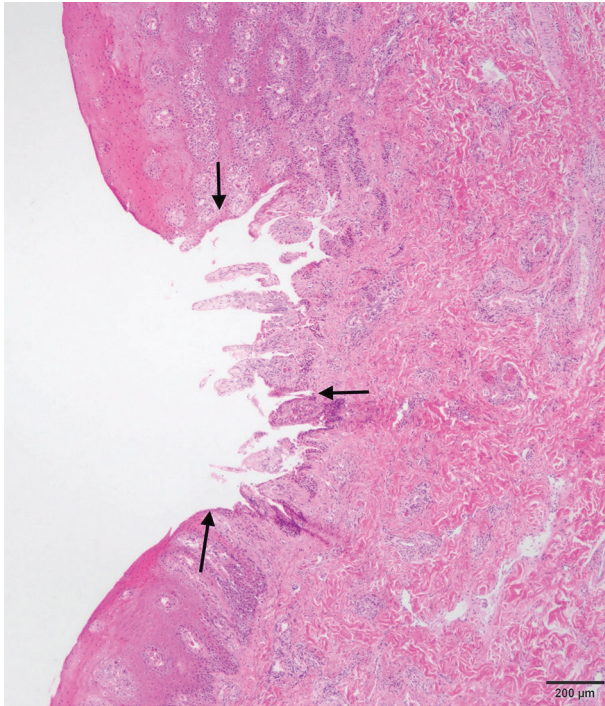


Figure 1. Histopathology of the oral mucosa. Ulcerative changes (arrows). H&E, bar = 200 µm.

Inflammatory changes in the vessel walls of the brain were usually seen associated with hemorrhage in the pons, cerebrum (Figure 2) and meninges. Degenerative changes in the brain parenchyma were also noted. In addition to these findings, diffuse mononuclear cell infiltration in the submucosa of the pharynx together with hemorrhage; diffuse hemorrhage and mononuclear cell infiltration around vessels of tonsils; mononuclear cell infiltration in the vessel wall at the junction of the cornea and sclera of the eye were also observed.

The most prominent changes in the kidney were mild inflammatory cell infiltrations of lymphoblastic and lymphocytic cells around the glomeruli

and interstitium in the cortex (Figure 3) and extensive hemorrhagic areas in the cortex and medulla. The degenerative changes in the epithelium of the tubules near the areas where hemorrhage was noted. The common areas of hemorrhage and necrosis were prominent in the adrenal cortex and medulla.

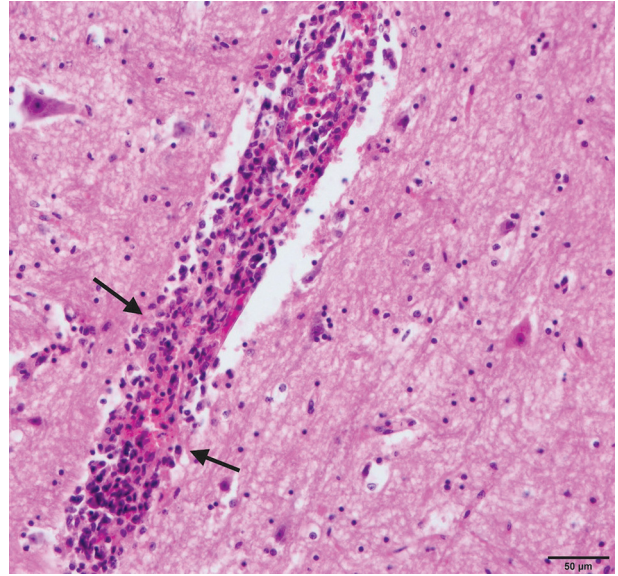


Figure 2. Histopathology of the cerebrum. Severe inflammatory changes in the vessel wall (arrows). H&E, bar = 50 µm.

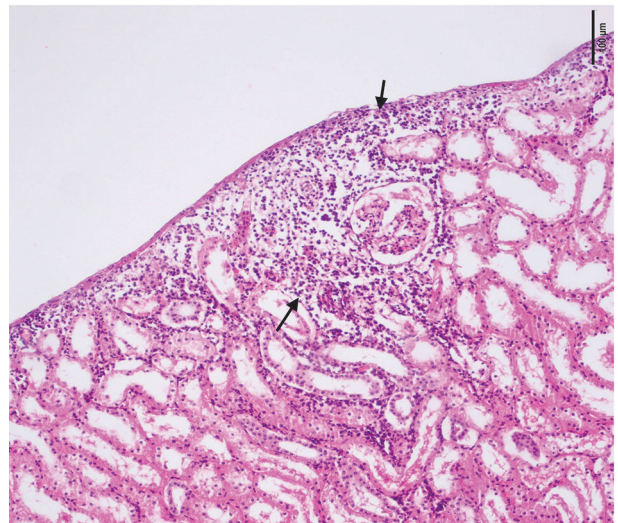


Figure 3. Histopathology of the kidney. Inflammatory cell infiltrations around the glomeruli and interstitium in the cortex (arrows). H&E, bar = 100 µm.

In virological analysis conducted to determine the cause of the disease; while tissue samples were not positive in terms of BVDV and BoHV-1, 386 bp

product was obtained as a result of PCR analysis performed by primer sequences that amplified the pol gene region of OvHV-2 (Figure 4).

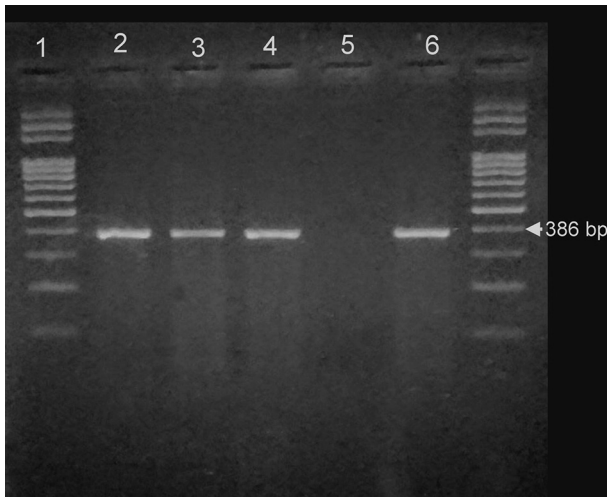


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from different DNA samples with primers specific for OHV-2. Lane 1, 100-bp DNA ladder; lanes 2 to 4, DNA extracted from lymph nodes, brain and liver samples, respectively; lane 5, no-DNA control; lane 6, positive control.

Discussion and Conclusion

MCF was identified in Turkey for the first time in 2003 (Dabak and Bulut 2003). Since then, sporadic cases or outbreaks of MCF have been encountered from time to time (Yıldırım et al. 2012; Kırbaş et al. 2013). In these cases, the disease is reported to occur in cattle housed in the same environment of sheep. In the presented case, the sheep herd was reported to be very close to the cattle herd with MCF disease. It was also shown that the disease was formed by OvHV-2 by PCR method. However, the lack of direct contact between cattle and sheeps suggested that aerosol transmission could also play a role in the transmission of the disease.

The diagnosis of MCF is based on clinical symptoms together with pathological findings. Especially, histopathological changes are accepted as the gold standard in the definitive diagnosis of the disease by some authors (Baxter et al. 1993; Russell et al. 2009). In postmortem examinations, petechial hemorrhages and ulcers on the tongue, buccal mucosa, in the gastrointestinal tract, respiratory tract and urinary bladder, raised pale foci on the surfaces of the kidneys, general enlargement of lymph nodes are noted. Microscopically, MCF is characterized by the accumulation of lymphocytes in different tis-

ues sometimes associated with fibrinoid necrotic vasculitis and necrotic lesions (Russell et al. 2009). In the present case, Macroscopically, all superficial and visceral lymph nodes were large and edematous; pharyngeal and laryngeal mucosa was edematous and hyperemic; the kidney was multicolored with a multifocal distribution of gray-white colored foci of 2-4 mm in diameter. Histologically, changes in the vessel wall in many organs are very important in the preliminary diagnosis of MCF. Fibrinoid necrotic vasculitis in all tissues and organs, especially in the liver and central nervous system was prominent and determinative histopathological finding. Additionally, the PCR method, which is based on the amplification of viral DNA, has been widely used in the diagnosis of diseases in recent years. Use of PCR method enables sensitive affirmation of the presence of MCF viruses in infected animals. Conventional and real-time PCR assays have been used to detection of OvHV-2 and AIHV-1 viral DNA (Baxter et al. 1993; Flach et al. 2002; Russell et al. 2009). In this case, conventional PCR assay was performed to confirm the causative agent of disease. According to these assays, 386 bp product was obtained by primer sequences that amplified the pol gene region of OvHV-2. This finding confirmed our diagnosis as SA-MCF.

In conclusion, our experience with the case described in this report has led us to perform PCR method to establish a reliable diagnosis and develop the disease control strategies in MCF.

References

1. Baxter SI, Pow I, Bridgen A, Reid HW. (1993). PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch Virol.* 132, 145–159.
2. Bedelian C, Nkedianye D, Herrero M. (2007). Maasai perception of the impact and incidence of malignant catarrhal fever (MCF) in southern Kenya. *Prev Vet Med.* 78: 296–316.
3. Boye M, Kamstrup S, Dalsgaard K. (1991). Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Vet Microbiol.* 29, 1–13.
4. Crawford TB, Li H, Rosenberg SR, Norhausen RW, Garner MM. (2002). Mural folliculitis and alopecia caused by infection with goat-associated malignant catarrhal fever virus in two Sika deer. *J Am Vet Med Assoc.* 221: 843–847.
5. Dabak M, Bulut H. (2003). Outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in Turkey. *Vet Rec.* 152, 240–241.
6. Esteves PA, Dellagostin O, Pinto LS, Silva AD, Spilki FR, Ciacci-Zanella JR, Hubner SO, Puentes R, Maisonnave J, Franco AC, Rijsewijk FAM, Batista HBCR, Teixeira TF, Dezen D, Oliveira AP, David C, Arns CW, Roeh PM. (2008). Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV)1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Res.* 131, 16–22.

7. Flach EJ, Reid H, Pow I, Klemm A. (2002). Gamma herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res Vet Sci.* 73, 93–99.
8. Kırbaş A, Oruç E, Özkanlar Y, Sözdutmaz İ, Aktaş MS, Sağlam YS. (2013). Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever: First report in a Calf in Northeastern Turkey. *Israel J Vet Med.* 68 (3): 195-200.
9. Li H, O'Toole D, Kim O, Oaks JL, Crawford TB. (2005). Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. *J Vet Diagn Invest.* 17, 171–175.
10. Russell GC, Stewart JP, Haig DM. (2009). Malignant catarrhal fever: A review. *Vet J.* 179, 324-335.
11. Yıldırım Y, Dağalp SB, Yılmaz V, Majorashin ARF. (2012). Molecular characterisation of ovine herpesvirus type 2 (OvHV-2) in Turkey. *Acta Vet Hung.* 60 (4): 521–527.



Taze tavuk etlerinde aktif ambalajlama uygulamaları

Özge Özer¹, Farnaz Naserifar², Özlem Kızılırmak Esmer³

^{1,2,3} Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye.

Geliş tarihi / Received: 23.11.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 06.03.2020

Özet: Tavuk eti yüksek protein ve nem içeriği nedeniyle hem mikrobiyal hem de biyokimyasal bozulmalara oldukça açık olmasından dolayı raf ömrü kısa olan bir gıdadır. Ayrıca gerek gıdanın doğası gerek işleme koşulları nedeniyle patojen mikroorganizmalarla kontamine olma ihtimali yüksektir. Bu açıdan taze tavuk etinin güvenilir bir şekilde üretimini arttırmak ve son tüketiciye ulaşana kadar israf olmasını önlemek amacıyla mikrobiyal güvenliğini sağlamak oldukça önemlidir. Taze tavuk etlerinde koruyucu katkı maddeleri ilavesi, ısı işlem uygulamaları ve/veya dondurma vb. gıda muhafaza yöntemleri kullanılmamaktadır. Bu nedenle de üründe gerçekleşebilecek biyokimyasal değişimler ve mikrobiyal bozulmaları önlemek için ambalajlama teknolojilerinden yararlanılması işlenmiş gıda ürünlerine göre daha da önem kazanmaktadır. Yenilikçi ambalajlama teknolojileri ile taze tavuk etlerinin kalitesi artırılıp raf ömrü uzatılabilir. Bu bağlamda aktif ambalajlama teknolojilerinden yararlanılabilir. Bu uygulamalarda ambalaj malzemesine ya da ambalaj ortamına eklenen antimikrobiyal ve antioksidan maddeler, CO₂, etanol vs. gibi aktif maddelerin etkisiyle gıdanın özellikleri ambalajlandıktan sonra da iyi bir şekilde muhafaza edilebilmektedir. Son yıllarda taze tavuk etlerinin aktif ambalajlama teknolojisi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda; antimikrobiyal ya da antioksidan özelliklerde esansiyel yağlar ile doğal bitki ya da gıda sanayii atıklarından elde edilen ekstraktlar kullanılarak hazırlanan sentetik ve/veya biyobozunur polimerler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknoloji ile ambalajlanmış taze tavuk etlerinde bozulma yapan mikroorganizmaların üreme hızlarının yavaşlatıldığı, patojen mikroorganizmaların üremesinin engellendiği ve/veya lipid oksidasyon hızının azaltıldığına yönelik sonuçlar bulunmaktadır. Bu derlemede aktif ambalajlama uygulamalarının taze tavuk etlerinin kalitesi, güvenilirliği ve raf ömrü üzerine etkilerini araştıran bilimsel çalışmalar değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aktif Ambalajlama, Antimikrobiyal Ambalajlama, Antioksidan Ambalajlama, İnovatif Ambalajlama, Taze Tavuk Eti

Active packaging applications in fresh chicken meat

Abstract: Chicken meat is a food, with a short shelf life due to its high protein and moisture content, which is highly susceptible to both microbial and biochemical degradation. Furthermore, to increase the reliable production of fresh chicken meat and to ensure its microbial safety in order to prevent wasting until reaching the end consumer are very important due to the possibility of contamination with pathogenic microorganisms which are caused by the food nature and processing conditions. In fresh chicken meats, since food preservation methods like addition of preservatives, heat treatment applications and / or freezing etc. are not used; the use of packaging technologies to prevent biochemical changes and microbial deterioration in the product becomes more important than processed food products. With innovative packaging technologies, the quality of fresh chicken meats can be increased and the shelf life extended, thus ensuring better food safety. Active packaging technologies can be utilized in this context. For this purpose, by the action of active ingredients such as antimicrobial substances, antioxidant substances, CO₂, ethanol, etc. added to the packaging material or packaging medium, the properties of the food can also be maintained well after packaging.

In recent years, in the studies on the active packaging technology of fresh chicken meat; synthetic / biodegradable polymers are started to be used which are prepared by using essential oils, extracts from natural plant or food industry wastes, with antimicrobial or antioxidant properties. For fresh chicken meats packed with this technology; there are results that the reproduction rate of the degrading microorganisms is slowed, the growth of pathogen microorganisms is inhibited and/or lipid oxidation rate is reduced. In this review, scientific studies investigating the effects of active packaging applications on the quality, safety and shelf life of fresh chicken meats were evaluated.

Key words: Active Packaging, Antimicrobial Packaging, Antioxidant Packaging, Fresh Chicken Meat, Innovative Packaging,

Giriş

Tavuk eti, özellikle yüksek protein oranından dolayı besin değeri yüksek, kırmızı ete göre nispeten daha

ucuz ve bu özellikleri nedeniyle oldukça sık tüketilen bir gıda türüdür. Ancak yüksek protein ve nem oranından dolayı pek çok mikroorganizmanın geli-

şimini teşvik etmesi nedeniyle hem mikrobiyal olarak hem de biyokimyasal olarak kolay bozulabilen ve bu nedenle raf ömrü kısa olan bir gıda maddesidir (Ghollasi-Mood ve ark. 2016). Kanatlı etlerinde bozulmaya neden olan baskın tür *Pseudomonas* türleridir. Bunun yanısıra *Brochothrix thermosphacta*, Laktik asit bakterileri, *Enterobacteriaceae* familyası *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Enterococcus* türleri ve bazı mikroaerofilik mayaların da taze tavuk etlerinin bozulmasında önem taşıdığı bilinmektedir (Rouger ve ark. 2017; Şireli 2019). Bozulma yapan bakterilerin yanı sıra taze tavuk etlerinin mikrobiyal kontaminasyonunda insanlarda sindirim sistemi rahatsızlıklarına sebep olan *Salmonella*, *Campylobacter* türleri ve *Listeria monocytogenes* gibi önemli patojenler de rol almaktadır (Rouger ve ark. 2017). Bundan dolayı taze tavuk etlerinin mikrobiyal kalitesi ve güvenilirliği, üretimi ve tüketimi artırmak için gıda sanayii açısından oldukça önemlidir. Raf ömrü sırasında bozulma yapan bakterilerin üremesi ve metabolik aktiviteleri sonucunda ürünlerin renk, koku, tat ve dokusal özelliklerindeki olumsuzluklar nedeniyle her yıl binlerce ton tavuk eti atık durumuna gelmekte ve önemli ekonomik kayıplar olmaktadır.

Taze tavuk etlerinin kısa raf ömründen dolayı hem gıda sanayi hem de bilim adamları bu tür ürünlerin raf ömrünü uzatmak, kalite özelliklerini muhafaza etmek için yeni teknolojiler üzerinde odaklanmışlardır. Bu bağlamda gerek gıda kalitesini ve gıda güvenilirliğini sağlamaya yönelik, gerekse de gıdanın raf ömrünü uzatmaya ve böylelikle gıdaların atık durumuna gelmesini önlemeye yönelik olarak inovatif ambalajlama teknolojileri oldukça önem arz etmektedir. Bu derleme çalışmasında; inovatif ambalajlama teknolojilerinden aktif ambalajlama uygulamalarının gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar temelinde taze tavuk etlerinin kalitesi ve güvenilirliği açısından etkileri incelenmiştir.

Aktif Ambalajlama Teknolojisi

Ambalajlama teknolojisinin amacı; gıdayı oksijen, nem, ışık gibi dış faktörlerin etkisinden ve her türlü bulaşmadan koruyarak muhafaza etmektir (Vilela ve ark. 2018; Yıldırım ve ark. 2018). Aktif ambalajlama teknolojisinde ise ambalaj malzemesine ekstra özellikler kazandırılarak gıdanın kalitesini muhafaza etmek, gıda güvenilirliğini sağlamak, raf ömrünü uzatmak amaçlanmaktadır. Bu teknolojiye ambalaj materyali, ambalaj ortamı ve gıda maddesi, ambalajın içinde gerçekleşen olayları kontrol altına alabilmek, bunlara tepki verebilmek ve değişen koşullara göre gıdanın muhafazasına ve kalitesini ko-

rumaya yönelik istenen değişimleri gerçekleştirebilmek adına karşılıklı etkileşim içinde bulunmaktadır (Singh ve ark., 2011; Vilela ve ark. 2018; Souza ve ark. 2019). Bu amaçla ambalaj malzemesine ya da ambalaj ortamına bazı aktif maddeler eklenmekte ve aktif maddeler "emici-tutucu" ya da "salıcı-yayıcı" sistemler olarak iki farklı prensiple çalışmaktadır. Gıdanın bozulmasına neden olan CO₂, O₂, etilen, nem, kötü aroma bileşenleri gibi maddeler ambalaj ortamından uzaklaştırılarak ya da antimikrobiyal ve antioksidan maddeler, CO₂, etanol ambalaj ortamına eklenerek gıdanın özellikleri daha iyi muhafaza edilebilmektedir (Keokamnerd ve ark. 2008; Lorenzo ve ark. 2014; Majid ve ark. 2018).

Aktif ambalajlama teknolojisinde aktif maddeler, direkt ambalaj malzemesine eklenebildikleri gibi minik poşet şeklinde ya da etiket şeklinde ambalaj içerisine ayrı bir materyal olarak da eklenebilirler ya da içecek gibi gıdaların konulduğu şişelerde şişe kapağına da yerleştirilebilirler (Üçüncü, 2007; Kızıllırmak Esmer ve Şahin, 2018).

Taze Tavuk Etlerinde Antimikrobiyal ve Antioksidan Ambalajlama Uygulamaları

Aktif ambalajlama teknolojileri içerisinde en fazla kullanım alanı bulmuş olan uygulamalar antimikrobiyal ve antioksidan ambalajlamadır. Antimikrobiyal ambalajlama teknolojisinde, gıdalarda mikrobiyal üremenin engellenmesi veya yavaşlatılması; antioksidan ambalajlama teknolojisinde ise oksijene duyarlı gıdaların oksidasyon stabilitesinin artırılması ve böylece gıdanın oksidatif bozulmalardan korunması amaçlanmaktadır. Her iki ambalajlama teknolojisinde de aktif bileşenler ambalaj materyalinin yapısına veya ambalaj ortamına eklenmekte ya da ambalaj materyali aktif bileşenlerle kaplanmaktadır (Han 2000; Appendini ve Hotchkiss, 2002; Suppakul ve ark., 2003; Azlin-Hasim ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016). Bu anlamda en fazla uygulama alanı bulmuş olan gıda maddeleri ise taze et ürünleridir (Gibis ve Rieblinger 2011).

Antimikrobiyal ve antioksidan ambalajlama uygulamalarında, aktif maddenin ambalaj materyaline veya ambalaj içine eklenmesinin, katkı maddesinin gıdaya eklenmesine göre bazı avantajları bulunmaktadır (Khaneghah ve ark. 2018). Aktif ambalajlamada aktif maddelerin salımı yavaş ve kontrollü bir şekilde gerçekleşmekte, daha düşük konsantrasyonlarda koruyucu katkı maddesi kullanılabilen, püskürtme, karıştırma, daldırma gibi katkı maddesini gıdaya uygulama proseslerine gerek kalmamaktadır (Ahmed ve ark. 2017). Direkt gıda formülasyonuna

eklenen antimikrobiyal ya da antioksidan özellikteki maddeler gıdanın lezzet, renk ya da viskozite gibi kalite özelliklerini olumsuz etkileyebilirken, bu teknoloji ile bu olumsuzlukların önüne geçilebilmektedir (Mastromatteo ve ark. 2010; Dicastillo ve ark. 2013; Tian ve ark. 2013).

Son yıllarda tüketicilerin daha doğal gıdalara olan talepleri doğrultusunda, tavuk etinde ürünün raf ömrünün uzatılması ya da güvenilirliğinin artırılması amacıyla aktif ambalajlama teknolojilerinde de daha doğal bileşenlerin kullanılması üzerine araştırmalar yoğunlaşmaktadır (Azlin-Hasim ve ark. 2015). Özellikle son yıllarda, antimikrobiyal ya da antioksidan özellikte esansiyel yağların, doğal bitki ya da gıda sanayii atık ekstraktlarının kullanılarak hazırlandığı gerek sentetik gerekse biyobozunur polimerler ile ambalajlanmış taze tavuk etlerinde bozulma yapan mikroorganizmaların üreme hızlarının yavaşlatıldığı, patojen mikroorganizmaların üremesinin engellendiği ve/veya lipid oksidasyonu hızının yavaşlatıldığına yönelik sonuçlar bulunmaktadır.

Aktif ambalajlamada da kullanılan nano malzemeler, özellikle mekanik ve bariyer özellikleri zayıf olan biyobozunur ambalaj materyalinin bu olumsuz özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılan nano boyutlarda dolgu maddeleridir (Panea ve ark. 2014). Bazı çalışmalarda esansiyel yağlar nano malzemelerle kombine edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmaların birinde taze kümes hayvanları etleri, % 2 biberiye veya % 2 zencefil esansiyel yağı içeren kitosan / montmorillonit (MMT) nanobiyokompozit filmlerle ambalajlanmıştır. MMT eklenmemiş kitosan filmlere kıyasla MMT eklenmiş kitosan filmlerin lipid oksidasyonunu yarı yarıya düşürme etkisi olduğu ve aerobik mezofilik bakteri ve toplam koliform sayısını % 6-16 oranında azalttığı görülmüştür. Nanokil ilavesi, kitosan filmlerin bariyer özelliklerini geliştirme nedeniyle kitosan filmlerin antimikrobiyal ve antioksidan etkisini arttırmıştır. Ancak esansiyel yağların, kitosan/MMT nanobiyokompozit filmlere herhangi bir ekstra antimikrobiyal özellik sağlamadığı ve taze kanatlı etlerinin raf ömrünü arttırmada herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Pires ve ark. 2018). Tek veya iki katlı olarak hazırlanan, % 15 oranında üzüm çekirdeği ekstraktı (ÜÇE) ve/veya % 2 oranında nanoselüloz (NS) içeren kitosan ve/veya polikaprolakton filmlerin, tavuk göğsü filetosunun alt ve üst kısımlarına yerleştirildiği ve alçak yoğunluklu polietilenle ambalajlandığı bir çalışmada, hazırlanan antimikrobiyal filmlerin; toplam aerobik mezofilik bakteri, toplam koliform bakteri ve lipid oksidasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. ÜÇE'nin tavuk göğsü fileto örneklerindeki lipid ok-

sidasyonunu ve mikrobiyal gelişmeyi engellemede NS içeren kitosan filmlerle birlikte kullanıldığında daha etkili olduğu ve NS'nin tavukgöğsü filetoları üzerine ÜÇE'nin salımını yavaşlattığı ve böylece 15 gün boyunca antioksidan aktivitenin sağlanabildiği belirlenmiştir (Söğüt ve Seydim 2019). Başka bir çalışmada, % 50 tarçın esansiyel yağını antimikrobiyal etkili gümüş-bakır (Ag-Cu) (% 4) nanoparçacıklarıyla beraber içeren ve sıkıştırma döküm yöntemiyle üretilen lineer alçak yoğunluklu polietilen veya polilaktasit filmler üretilmiştir. Aktif özellikteki ambalaj malzemesiyle ambalajlanan patojen inoküle edilmiş taze tavuk etinin 4°C'de 21 gün süreyle depolanması sırasında *Salmonella typhimurium* ve *Campylobacter jejuni*'nin üremesinin tamamen engellendiği ve *Listeria monocytogenes*'in ise üremesinin önemli ölçüde yavaşlatıldığı belirlenmiştir (Ahmed ve ark. 2018a, 2018b).

Başka bir çalışmada ise biyoaktif bileşenlerin etkinliklerini korumak amacıyla uygulanan yöntemlerden biri olan enkapsülasyon yöntemiyle çay ağacı yağı liposoma enkapsüle edilerek kitosandan elektroçirme (elektrospinning) yöntemiyle aktif özellikte nanofilm üretilmiştir. Bu aktif özellikte nanofilmine ambalajlanan tavuk etindeki *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella enteritidis* üremesi üzerindeki antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiş, enkapsüle edilmiş çay ağacı yağı liposomunun *Salmonella* üzerinde yüksek antibakteriyel etki gösterdiği ve bu esnada duyuşal özellikler üzerinde de herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı ve tavuk etinin raf ömrünü uzattığı görülmüştür (Cui ve ark. 2018). Elektroçirme yönteminin kullanıldığı başka bir çalışmada ise gıdalar için doğal bir antimikrobiyal katkı maddesi olan ε-polilizin (ε-PL) ve kitosan kullanılarak nanolif üretilmiş ve *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella enteritidis* patojenleriyle inoküle edilmiş taze tavuk etleri bu malzeme ile ambalajlanmıştır. 4°C'de 14 gün ve 25 °C'de 7 gün depolama süresince antimikrobiyal etki ve duyuşal özellikler incelenmiştir. ε-polylysine içermeyen kontrol gruplarında depolama süresi sonunda çok daha yüksek mikroorganizma sayılarına ulaşırlırken, ε-PL/kitosan filmde yaklaşık 3 logaritmik birimlik azalma olduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar 4°C depolama sıcaklığında da alınmıştır. Bu çalışma nanoliflerin gıda ambalajı olarak önemli ölçüde etkili antibakteriyel potansiyele sahip olduğunu ve ambalajlanmış gıdanın duyuşal özelliklerini de daha iyi muhafaza ederek raf ömrünü artırdığını göstermiştir (Lin ve ark. 2018).

Dökme plak yönteminin uygulandığı bir çalışmada, fenolik bileşenler açısından zengin olan yer-

fıstığı zarı ve pembe karabiber sanayi atıklarının ekstraktları sırasıyla % 0.84 ve % 1.90 oranında kullanılarak hazırlanmış kitosan filmlerle kemiksiz ve derisi alınmış tavuk baget eti ambalajlanmıştır. Lipid oksidasyonuna yönelik oksidatif stabiliteyi sağlamak açısından 4°C'de 7 günlük depolama süresi boyunca her iki ekstraktın da, sektörde sentetik antioksidan olarak kullanılan bütillendirilmiş hidroksitoluen kadar etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca mezofilik bakteri sayısında doğal antioksidan içermeyen kontrol grubuna göre bir farklılık görülmemesine rağmen psikrotrofik bakteri sayılarının aktif ambalajlama uygulamasında kontrol örneğine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Serrano-León ve ark. 2018). Dökme plak yönteminin uygulandığı başka bir çalışmada ise farklı oranlarda selülozdan üretilen bir biyopolimer olan karboksimetil selüloz, biyobozunur film uygulamalarında oldukça iyi bir potansiyele sahip petrol türevli bir plastik olan polivinil alkol ve % 1, 2, 3 konsantrasyonda karanfil esansiyel yağı kullanılarak hazırlanan filmlerle ambalajlanan tavuk kıymasının buzdolabı koşullarında 12 gün süreyle depolanması sonucunda; % 3 oranında karanfil yağı içeren aktif filmle ambalajlanmış tavuk kıymasının raf ömrünün, karanfil yağı eklenmemiş kontrol numunesine kıyasla 4 günden 12 güne çıktığı tespit edilmiştir. Aktif filmlerle ambalajlanmış tavuk eti kıymasına inoküle edilen *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'un depolama süresi boyunca üremesinin azalarak 12. günden itibaren tamamen inhibe edildiği gözlenmiştir (Muppalla ve ark. 2014). Karanfil esansiyel yağı kullanılan başka bir çalışmada ise, kromik asit ile modifiye edilen lineer alçak yoğunluklu polietilen film bu yağla kaplanarak, *Salmonella typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* inoküle edilmiş tavuk etinin ambalajlanmasında kullanılmıştır. 4°C'de 21 gün süreyle depolama boyunca belirtilen patojenlere karşı etkin bir antimikrobiyal etki gözlenmiş ve depolama süresi boyunca üremenin azalarak 5. günden itibaren tamamen inhibe edildiği belirlenmiştir (Mulla ve ark. 2017). Dökme plak yönteminin uygulandığı başka bir çalışmada ise tavuk fileto örnekleri, polipropilen /etilen vinil alkol kopolimer tepsilerin orta kısmına, dökme plak yöntemiyle hazırlanmış farklı boyutlardaki kekik esansiyel yağının bileşeni olan karvakrol içeren kitosan/siklodekstrin antimikrobiyal filmler yerleştirilerek ambalajlanmıştır. 4°C'de 9 gün depolama sonucunda, toplam mezofilik bakteri, toplam psikrotrofik bakteri, *Pseudomonas* türleri, Enterobacteriaceae, laktik asit bakterileri, maya ve mantarlara karşı tepsilere yerleştirilen aktif filmlerin yüzey alanıyla ve depolama süresiyle doğru orantılı olarak antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiş ve

en fazla yüzey alanına sahip filmin test edilen tüm mikroorganizmalar için yaklaşık olarak 1 logaritmik azalma sağladığı görülmüştür (Higuera ve ark. 2014). Aynı yöntemin kullanıldığı bir diğer çalışmada, % 20 ve % 50 oranında biberiye esansiyel yağı (BEY) içeren ve dökme plak yöntemiyle hazırlanmış selüloz asetat bazlı filmler polistiren tabaklar içerisine yerleştirilerek, dilimlenmiş tavuk göğsü ambalajlandığı bir çalışmada ise aktif özellikteki filmlerin toplam psikrotrofik bakteri ve toplam koliform bakteri üzerindeki etkisi 2°C'de 6 gün boyunca test edilmiştir. % 20 BEY içeren filmler her iki mikroorganizmayı inhibe etmede herhangi bir etki göstermezken, % 50 BEY içeren filmler psikrotrofik bakterileri inhibe etmede herhangi bir etki göstermemiş ancak toplam koliform bakteri sayısında 2 logaritmik birim azalma sağlamıştır (De Melo ve ark. 2012).

Polietilen tereftalat (PET) filmlerle yapılan bir çalışmada ise, katman katman bir araya getirme yöntemiyle (layer-by-layer teknik) % 1 siyah kimyon esansiyel yağı içeren aljinat ve kitosan kaplanmış aktif özellikteki PET filmler, köpük plastik tabakların ortasına yerleştirilerek tavuk göğüs etinin ambalajlanmasında kullanılmıştır. Bu filmlerin aktif özellikteki PET film içermeyen kontrol örneğine göre 4°C'de 5 gün depolama süresi boyunca mezofilik ve psikrotrofik bakteri üremesini düşük oranda da olsa geciktirdiği ve daha iyi sonuçlar elde edebilmek için daha yüksek esansiyel yağ konsantrasyonlarının çalışılması gerektiği belirtilmiştir (Konuk Takma ve Korel 2018). Alçak yoğunluklu polietilen filmlerin kullanıldığı başka bir çalışmada ise filmlerin yüzeyine biberiye ekstraktının kaplanmasıyla elde edilen aktif filmle ambalajlanmış ve 5°C'de depolanmış tavuk köftesinde lipid oksidasyonunun 25 güne kadar geciktirdiği ve bu sayede raf ömrünün uzatıldığı belirlenmiştir (Bolumar ve ark. 2011). *Lactococcus lactis*'in fermentasyonu ile elde edilen bir bakteriyosin olan nisin veya kitosan ilave edilerek plastik işleme yöntemlerinden biri olan ekstrüzyon yöntemiyle elde edilen alçak yoğunluklu polietilen ambalajların, 6 gün boyunca 5°C'de depolanmış tavuk bagetlerin fizikokimyasal ve mikrobiyal kalitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, kitosanın aerobik mezofilik bakteri, toplam koliform ve küf ve maya üzerinde en etkili antimikrobiyal ajan olduğu, nisin de aynı mikroorganizmalar üzerinde kitosana kıyasla daha düşük de olsa antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanısıra lipid oksidasyonu da nisin veya kitosan içermeyen kontrol örneklerine göre önemli ölçüde engellenmiştir. Yapılan bu çalışma kitosan ve nisin içeren aktif ambalajların tavuk bagetlerinin ambalajlanmasında gıda kalitesi ve güvenilirliğini arttırdığını

ve ambalajlama için uygun olduğunu göstermiştir (Soysal ve ark. 2015).

Sonuç

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki inovatif ambalajlama uygulamaları taze tavuk eti kalitesinin ve güvenilirliğinin sağlanmasında oldukça etkili olacak uygulamalardır. Çalışmaların bir bölümünde aktif ambalaj üretiminde ekstrüzyon gibi endüstriyel ambalaj üretim yöntemleri uygulanmıştır. Aktif özellikte bu filmlerin endüstriyel olarak kullanılabilmesi için endüstriyel ambalaj üretim yöntemlerine uyarlanması gerekmektedir. Özellikle doğal bileşenler söz konusu olduğunda ambalaj üretim yöntemleriyle bu bileşenlerin ambalaj malzemesinde ne kadar etkin bir oranda kalabildiği önemlidir. Bu nedenle enkapsülasyon tekniği gibi biyoaktif maddelerin ko-

runmasında etkili olan yöntemler önem kazanmaktadır. Ayrıca esansiyel yağlar keskin aromalı bileşenler olduğu için çok yüksek konsantrasyonda uygulanamamaktadırlar. Bu nedenle bu tür çalışmalarda aktif bileşen konsantrasyonlarının, ürünün özelliklerini korumadaki etkisi ve ürünün duyuşal özellikleri üzerine etkisinin birlikte çalışılarak optimize edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra üretim maliyetleri yeni bir teknolojinin uyarlanmasında kritik bir öneme sahip olduğundan maliyet hesaplarının yapılması da göz ardı edilmemesi gereken bir durumdur. Ancak aktif maddelerin sağlayacağı faydayla kıyaslandığında yaratacağı maliyet farklılığının çok önemli olmayacağı düşünülmektedir. Tablo 1'de antimikrobiyal doğal bileşenleri içeren ve ticari olarak mevcut bazı antimikrobiyal ambalaj örnekleri görülmektedir.

Tablo 1. Doğal bileşenleri içeren ve ticari olarak mevcut bazı antimikrobiyal ambalajlama örnekleri (Ahmed ve ark. 2017; Fang ve ark. 2017)

Ticari İsmi	Üretici Firma	Aktif Bileşen	Kullanım Şekli
Wasaouro sheets™	Mitsubishi-Kagaku Foods Co., Japan	Alil izotiyosiyanat	Antifungal, antibakteriyel filmler ve etiketler
Wasapower™	Sekisui Plastics Co., Ltd., Japan	Siklodekstrin içinde enkapsüle edilmiş wasabi özütü	Kaplı PEF (Polietilen furanat)
WasaOuro	Lintec Co., Japan	Alil izotiyosiyanat	Levhalar
Bioka™	Bioka Ltd., Finland	Glikoz oksidaz	Poşet

Kaynaklar

- Ahmed I, Lin H, Zou L, Brody AL, Li Z. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*. 82, 163-178. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009>
- Ahmed J, Arfat YA, Bher A, Mulla M, Jacob H. (2018b). Active chicken meat packaging based on polylactide films and bimetallic Ag-Cu nanoparticles and essential oil. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14121>
- Ahmed J, Mulla M, Ali Arfat Y, Bher A, Jacob H. (2018a). Compression molded LLDPE films loaded with bimetallic (Ag-Cu) nanoparticles and cinnamon essential oil for chicken meat packaging applications. *LWT - Food Science and Technology*. 93, 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.051>
- Appendini P, Hotchkiss JH. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 3(2), 113-126. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)
- Azlin-Hasim S, Cruz-Romero MC, Morris MA, Cummins E, Kerry JP. (2015). Effects of a combination of antimicrobial silver low density polyethylene nanocomposite films and modified atmosphere packaging on the shelf life of chicken breast filets. *Food Packaging and Shelf Life*. 4, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodpsl.2015.03.003>
- Bolumar T, Andersen ML, Orlien V. (2011). Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chemistry*. 129 (4), 1406-1412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.082>
- Cui H, Bai M, Li C, Liub R, Lin L. (2018). Fabrication of chitosan nanofibers containing tea tree oil liposomes against *Salmonella* spp. in chicken. *LWT-Food Science and Technology*. 96, 671-678. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.026>
- de Melo AAM, Geraldine RM, Silveira MFA, Torres MCL, E Rezende CSM. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43 (4), 1419-1427. doi: 10.1590/S1517-838220120004000025
- Fang Z, Zhao Y, Warner RD, Johnson SK. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*. 61 (2), 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002>
- Ghollasi-Mood F, Mohsenzadeh M, Housaindokht MR, Varidi M. (2016). Microbial and chemical spoilage of chicken meat during storage at isothermal and fluctuation temperature under aerobic conditions. *Iranian journal of veterinary science and technology*. 8 (1). doi: 10.22067/veterinary.v8i1.54563
- Gibis, D, Rieblinger K. (2011). Oxygen scavenging films for food application. *Procedia Food Science*. 1, 229 - 234. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.036>
- Han JH. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology*. 54 (3), 56-65. DOI: 10.1533/9781855737020.1.50
- Higuera L, López-Carballo G, Hernández-Muñoz P, Catalá R, Gavara R. (2014). Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin

- film. *International Journal of Food Microbiology*. 188, 53–59. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.018>
14. Keokamnerd T, Acton JC, Han IY, Dawson PL. (2008). Effect of Commercial Rosemary Oleoresin Preparations on Ground Chicken Thigh Meat Quality Packaged in a High-Oxygen Atmosphere. *Poultry Science*. 87, 170–179. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00066>
 15. Khaneghaha AM, Hashemib SMB, Limboc S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing*. 111, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>
 16. Kızılırmak Esmer Ö, Şahin B. (2018). Active packaging applied to dairy products. Conto F, Del Nobile DA, Faccia M, Zambrini AV, Conte A. Eds. *Advances in Dairy products*. John Wiley and Sons Ltd. UK., p. 356-377.
 17. Konuk Takma D, Korel F. (2018). Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. *Food Packaging and Shelf Life*. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.002>
 18. Lin L, Liao X, Surendhiran D, Cui H. (2018). Preparation of ε-polylysine/chitosan nanofibers for food packaging against Salmonella on chicken. *Food Packaging and Shelf Life*. 17, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.013>
 19. López de Dicastillo C, Castro-López MDM, López-Vilariño JM, González-Rodríguez MV. (2013). Immobilization of green tea extract on polypropylene films to control the antioxidant activity in food packaging. *Food Research International*. 53 (1), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.022>
 20. Lorenzo JM, Sineiro J, Amado IR, Franco D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Science*. 96, 526-534. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.007>
 21. Majid I, Nayik GA, Dar SM, Nanda V. (2018). Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 17, 454–462. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.003>
 22. Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile MA. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*. 21 (12), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010>
 23. Mulla M, Ahmed J, Al-Attar H, Castro-Aguirre E, Arfat YA. (2017). Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. *Food Control*. 73 (part B), 663–671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>
 24. Muppalla SHR, Kanatt SR, Chawla SP, Sharma A. (2014). Carboxymethyl cellulose–polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. *ScienceDirect*. 2 (2), 51–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.07.002>
 25. Panea B, Ripoll G, González J, Fernández-Cuello A, Albertí P. (2014). Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality. *Journal of Food Engineering*. 123, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.029>
 26. Pires JRA, Souza VGL, Fernando AL. (2018). Chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary and ginger essential oil as packaging for fresh poultry meat. *Food Packaging and Shelf Life*. 17, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.011>
 27. Rouger A, Tresse O, Zagorec M. (2017). Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms*. 5 (50). doi:10.3390/microorganisms5030050
 28. Serrano-León JS, Bergamaschi KB, Yoshida CMP, Saldaña E, Selani MM. (2018). Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. *Food Research International*. 108, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.031>
 29. Singh P, Wani A. A, Saengerlaub S. (2011). Active packaging of food products: Recent trends. *Nutrition and Food Science* 41 (4), 249–260. <https://doi.org/10.1108/00346651111151384>
 30. Sireli T. Kanatlı etlerinde bozulma. Erişim adresi: http://www.sagliklitavuk.org/assets/userfiles/files/uzmanlardan/Kanatli_Etlerde_Bozulma.pdf, Erişim Tarihi: 14 Ocak 2019
 31. Souza VGL, Pires JRA, Vieira ET, Coelho IM, Duarte MP, Fernando AL. (2019). Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. *Food Hydrocolloids*. 89, 241-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.049f>
 32. Soysal Ç, Bozkurt H, Dirican E, Güçlü M, Bozhüyük ED. (2015). Effect of antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of chicken drumsticks. *Food Control*. 54, 294–299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.009>
 33. Söğüt E, Seydim AC. (2019). The effects of chitosan- and polycaprolactone-based bilayer films incorporated with grape seed extract and nanocellulose on the quality of chicken breast fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 101, 799–805. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.097>
 34. Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science* 68 (2), 408–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x>
 35. Tian F, Decker EA, Goddard JM. (2013). Controlling lipid oxidation via a biomimetic iron chelating active packaging material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (50), 12397–12404. doi: 10.1021/jf4041832
 36. Vilela C, Kurek M, Hayouka Z, Rocker B, Yildirim S, Antunes MDC, Nilsen-Nygaard J, Pettersen MK, Freire CSR. (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 80, 212-222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>
 37. Üçüncü M, eds.. (2007). Gıda Ambalajlama Teknolojisi. 2.Baskı. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. İzmir. Pp.809-817.
 38. Yildirim S, Röcker B, Pettersen MK, Nilsen-Nygaard J, Ayhan Z, Rutkaite R, Radusin T, Suminska P, Marcos B, Coma V. (2018). Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17, 165-199. doi: 10.1111/1541-4337.12322
 39. Zhang H, Wu J, Guo X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*. 5, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.11.003>



Kanatlı hayvanlarda mukozal bağışıklık

Zeynep Şık¹

¹Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 02.10.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 20.05.2020

Özet: Antijenler vücuda mukozal alanlardan girer. Enfeksiyonlar mukozalarda oluşur ve yayılır. Mukozal lenfoid dokular (MALT), spesifik ve nonspesifik bağışıklığı birlikte uyarak antijenleri giriş yerinde yok ederler ve antijenin yayılmasını engeller. Kanatlı hayvanlar sindirim (GALT), solunum (Harderian bez, CALT, NALT, BALT) ve genital sistemde bulunan mukozal lenfoid dokuları ile gelişmiş bir mukozal bağışıklık sistemine sahiptir. Ancak kanatlı hayvanların mukozal lenfoid dokularının özellikleri ve savunma mekanizmalarına dair sınırlı bilgi vardır. Bu derleme kanatlı hayvanlarda bulunan mukozal lenfoid dokuları birlikte sunarak enfeksiyonların önlenmesindeki rolüne ve yeni mukozal aşı stratejileri geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: BALT, CALT, GALT, Kanatlı, NALT

Mucosal immunity in poultry

Abstract: Antigens enter the body through the mucosal surfaces. Infections occur and spread in mucosal surfaces. Mucosal lymphoid tissues (MALT), prevent specific and nonspecific immunity from spreading the antigens at the site of introduction by stimulating together. Poultry animals have a mucosal immune system developed with digestion (GALT), respiratory (Harderian gland, CALT, NALT, BALT) and mucosal lymphoid tissues found in the genital system. However, there are limited information about the properties and defense mechanisms of mucosal lymphoid tissues of poultry. This review will contribute to the role of prevention of infections and the development of novel mucosal vaccine strategies by presenting mucosal lymphoid tissues in poultry.

Key words: BALT, CALT, GALT, NALT, Poultry

Giriş

Kanatlı hayvanlarda bağışıklık sisteminin gelişimi, performans ve hayvanların yaşama gücü ile direkt ilişkilidir. Kanatlı hayvanlarda bağışıklık sistemi hızlı gelişir. Özellikle eti için yetiştirilen tavukların yaşama süresinin kısa olması, bağışıklık sisteminin gelişiminin izlenmesini zorunlu kılar. İmmun sistem üzerine olumsuz etki yapan faktörler nedeniyle oluşan immunsupresyon, hastalıklara karşı kanatlıların duyarlılığını artırır. Bu durum kanatlı hayvanların yaşama gücünü ve performans hedeflerini olumsuz etkilemektedir. Dünyada kanatlı eti üretiminin, tüm etler içinde en yüksek düzeyde olması nedeniyle kanatlı hayvanların bağışıklık sisteminin yapısı ve gelişimi iyi değerlendirilmelidir (Kaiser 2010, 2012). Kanatlı hayvan ürünlerinin tüketilmesiyle insanlara bulaşan Avian İnfluenza (Kuş gribi), *Salmonella* spp., ve *Campylobacter* enfeksiyonları büyük bir halk sağlığı sorunu oluşturur. Ayrıca hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotikler yumurta ve ette kalıntı bırakır ve bu ürünlerin de tüketilmesi insan sağlığını tehdit eder. Aynı zamanda antibiyotiklerin kullanımı ile gıda kaynaklı patojenlere karşı direncin ortaya çıkması ve yayılması ile ilgili endişelerin artması sonucunda

antibiyotik kullanımında sınırlamalara yol açmıştır. Mevcut kontrol önlemlerindeki sınırlamalar nedeniyle araştırmacıları yeni aşı stratejileri ve alternatif kontrol önlemleri geliştirmeye yöneltmiştir (Jawale ve Lee 2014; Kang ve ark. 2014; Gayet ve ark. 2017; Kumar ve ark. 2018).

Kanatlı hayvan üretiminde en önemli sorunlarından biri; hızlı bulaşan hastalıklardır. Kanatlı hayvanlarda bu hastalıkların neden olduğu kayıplar esas olarak aşılama ile azaltılabilmektedir. Aşılamalar ile uzun süreli bağışıklık ve koruma sağlanabilir. Özellikle kümes hayvanları üretiminde önemli ekonomik kayıplara yol açan enfeksiyöz bronşit (IB) virüsü gibi viral enfeksiyonlar mukozal yoldan yapılan aşılama ile kontrol edilebilir (Kang ve ark. 2014; De Geus ve ark. 2015). Mukozal aşıların geliştirilme çalışmalarında mukozal yüzeylerin hedeflenmesinin nedeni, mukozal alanlar patojenlerin giriş yerleri olmasıdır. Enfeksiyonlar mukozalarda oluşur ve yayılır (Yılmaz ve ark. 1995). Mukozal lenfoid dokuların en önemli görevi patojenleri giriş yerinde yok etmek ve enfeksiyonların yayılmasını önlemektir (Lillehoj ve Lillehoj 2000). Mukozal lenfoid dokuların önemli özelliklerinden biri de; spesifik ve nonspesifik baği-

şıklığı birlikte uyarabilmesidir. Spesifik bağışıklığın uyarılması uzun süre immunolojik belleğin oluşması demektir. Bu özelliğin kazanımlarından biri de herhangi bir mukozal yüzeyden aşı uygulaması yapıldığı zaman bu bölgeye en uzak mukozal dokuyu bile uyarabilmesidir (Saatçi ve Bozkır 2003).

Mukozal alanlarda gelişen konakçı bağışıklık yanıtlarının enfeksiyonların kontrolünde önemli rol oynadığından dolayı bu bölgedeki immunolojik olayları anlamak zorunludur (Amarasinghea ve ark. 2018). Kanatlı hayvanlarda mukozal lenfoid dokular arasında en çok solunum sisteminde bulunan lenfoid dokular çalışılmıştır. Solunum sistemi lenfoid dokuları arasında da en çok Harderian bez ve nazal ilişkili lenfoid doku çalışılmıştır. Nazal ilişkili lenfoid doku hem doğal enfeksiyonlarda hem de aşılama- larında immun yanıtlar için temel indüktif alan olarak kabul edilir. Çünkü aşı uygulamalarında burun boş- luğu kolayca erişilebilir, oral uygulamalar ile karşı- laştırıldığında düşük seviyede proteolitik enzimlere sahip olması ve yüksek derecede vaskülarize epitel tabakası ve bol lenfosit içeren geniş yüzey alanı ile aşı uygulamaları için en cazip yer oluşturmaktadır (Kang ve ark. 2013,2014; De Geus ve ark. 2015). Özellikle kanatlı hayvanlarda sindirim sisteminde bulunan bağırsak ilişkili lenfoid doku bölümlerinin histolojik yapısı hakkında birçok literatür bulunur iken immunolojik savunma mekanizması ve özellik- lerine dair az sayıda literatür vardır. Bağırsak ilişkili lenfoid doku daha çok insanlarda kapsamlı olarak araştırılmıştır.

Kanatlı Hayvanlarda Mukozal Bağışıklık (MALT)

Mukozal yüzeyler patojenlerin giriş yolu olduğu için sürekli patojenlerle karşılaşılır ve bu yüzden muko- zal bağışıklık, ilk savunmada önemlidir (Lamichhane ve ark. 2014). Yoğun musin tabakası, antimikrobial peptitler, sıkı bağlantılı (tight junction) proteinleri üreterek epitel hücreleri mukozal alanları korur (Kunisawa ve ark. 2012).

Lenfositler bağışıklık sisteminin önemli bileşen- leridir ve tüm mukozal dokuların yüzeyleri boyunca yer alan mukozal lenfoid doku yaklaşık %50 oranın- da lenfosit bulunur. MALT'ta bulunan immun sistem hücreleri; dendritik hücreler (DC), makrofajlar, T ve B lenfositleridir (Zhao ve ark. 2016). Mukozal len- foid dokuların üzerini örten özelleşmiş M hücreleri (Mebranöz epitel hücresi) lumenden antijenleri alıp taşınmasıyla ya da antijen sunan dendritik hücre- ler (APC) tarafından naif T ve B lenfositlerini uyarır (Pavot ve ark. 2012). Uyarılan T hücre alt sınıfları; sitotoksik CD8⁺ T hücreleri hasara uğramış konakçı hücrelerini yok eder ve CD4⁺ T hücreleri ise; istilacı

patojenleri yok ederek hücresele bağışıklığı uyarır (De Geus 2012). Antijene özgü etkileşimlerin bir sonu- cu olarak T hücreleri ve IgA ile ilişkili sitokin ailesi (TGF-β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), germinal merkez- de ve B hücrelerinde IgA sınıf değişimini destekler (Lamichhane ve ark. 2014). B hücrelerinde üretilen tek J zincirli dimerik IgA, mukozal epitel hücreleri- nin bazolateral yüzeyinde bulunan polimerik im- munglobulin reseptörüne (plgR) bağlanır ve sonra transsitoz ile mukozaya salınır. Transsitoz esnasın- da plgR'nin bir kısmı ayrılırken bir kısmı da dimerik IgA'nın Fc bölümüne bağlı kalır ve salgı bileşenini (slgA) oluşturur. Sistemik dolaşımında IgA (monome- rik ya da polimerik) yapısında bulunmaz (Shakya ve ark. 2016). IgA⁺, yüksek sentez hızı ve mukozal epi- telyum boyunca taşınabilme yeteneğiyle (Withanage ve ark. 1997) sindirim ve solunum sistemi mukozası sekresyonunda temel izotiptir. IgG⁺ (IgY⁺), kanda ve hücre dışı sıvıların temel izotipidir. IgG⁺, fagositozun ve komplement sistemin uyarılmasıyla patojenleri opsonize eder ve yutar. IgA⁺, fagositlerin olmadığı bölgelerde çalışarak hem nötralizasyonu sağlar hem de adezyonu engeller (Pavot ve ark. 2012).

Sindirim Sisteminde Mukozal Bağışıklık (GALT)

Sindirim yolu mukozası fiziksel ve biyolojik bariyer- lere sahip olmasına rağmen birçok patojen mikro- organizmalar için giriş kapısıdır (Kunisawa ve ark. 2012). Bağırsak epitel hücreleri; bakteri ve viral an- tijenleri patojen ilişkili moleküler modeller (PAMP) tarafından tanınarak tehlike sinyalleri nükleotit bağ- layıcı oligomerizasyon ailesi, Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi patojen tanıma reseptörleri (PRR) aracılı- ğıyla (Davison ve ark. 2008; Pavot ve ark. 2012), nükleer faktör κB (NF-κB) aktive edilen intraselüler yollar ile sitokinler, interferon gama (IFN-γ) ve tü- mör nekrozis alfa (TNF-α) salınmasını sağlar (Gayet ve ark. 2017; Kumar ve ark. 2018). Shira ve Friedman (2018); civciv bağırsak epitel hücrelerinin bakteriyel antijenlerin (LPS ve LTA) TLR'leri uyarmadan proenfl- amatuvar sitokinler IL-6 ve IL-18 salgıladığını bil- dirmiştir. Mukozal bariyerler epitel tabakasını korur ancak patojen mikroorganizmalar; bazolateral yü- zeylerde özel bir epitelyum içinde yer alan M hü- crelerinin adezyon ve invazyona uğramasıyla aktin polimerizasyon oluşumunun sonucunda yutulur. Sınırsız patojen invazyonuna uğrayan epitel doku bozulur ve açılır. Epitel dokusunun bozulmasıyla pa- tojenler bağırsak lümenine yerleşirler (Gayet ve ark. 2017; Kimura 2018). M hücreleri tarafından taşınan ve transsitosise uğramış antijenler bazal membran altında bulunan dendritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunan hücreler tarafından işlenerek an- tijenik peptidleri B ve T hücrelerine sunulurken len-

foid dokulara taşınır (Davison ve ark. 2008; Shakya ve ark. 2016). GALT'ın lenfoid dokularında bulunan T lenfositleri; naif T hücreleri ile IFN-gama üreten Th1 hücreleri, IL-4 ve IL-10 üreten Th2 hücreleri antijenleri yok ederler ve B lenfositlerinin IgA sınıf değişimi desteklerler (Kunisawa ve ark. 2012; Kumar ve ark. 2018).

Farengoyal Tonsiller

Lenfoid dokunun; lenfoid hücreleri ve folikülleri nazofarenkse yerleşmiştir. Kanatlı hayvanlarda koanal ve infundibular yarıklar etrafında bulunan bu doku kriptlerden yoksundur (Casteleyn ve ark. 2010).

Özefageyal Tonsiller

Memelilerde bulunmayan, kanatlılarda özefagus ile proventriculus bağlantısına yerleşmiş olan özefageyal tonsil; ince fibröz bir kapsülle çevrilmiş 6-8 birimden meydana gelen tonsil kriptlerinden oluşur (Aytürk 2008). Kriptler; lenfoepitelyumu oluşturur. Lenfo epitelyum; T lenfositleri, plazma hücreleri, makrofaj ve dendritik hücreler birlikte lenfoid dokuyu oluşturur (Çolakoğlu ve Dönmez 2018). Özefageyal tonsiller, Peyer Plakları gibi B hücrelerinin gelişimine ve çoğalmasına katkı sağlar (Davison ve ark. 2008).

Proventriküler Lenfoid Doku

T lenfositleri çoğunlukla mukozal dokunun lamina probriyasında bulunur. T lenfositleri merkezde, bezsel kanallar ve proventriküler lümeninde; B lenfositleri periferik bölgelere; proventriküler bezlerin dip kısmında yerleşmiştir (Casteleyn ve ark. 2010).

Pilorik Tonsil

Midenin sadece antimezenterik tarafında yer alan lenfoid doku; 15-20 adet tonsilden oluşur. Duedonum Lieberkühn kriplerini lenfoepitelyal alanlar tarafından tonsil kriptlerine dönüştürür. Kript alanlarını örten epitel hücreleri arasında M hücreleri vardır. B hücreleri germinal merkezde, CD3 T hücreleri interfoliküler bölgede, CD45⁺ hem interfoliküler hem de germinal merkezde bulunur (Nagy ve Olah 2007).

Meckel Divertikülü

Embriyonik dönemde vitellüs kesesinin bağırsak kanalına bağlanan sap kısmının yumurtadan çıktıktan sonra oluşan yaşam boyu kalıntısıdır (Lillehoj ve Trout 1996). Kuluçka döneminde Meckel divertikülünde; hiç lenfoid hücre bulunmazken kuluçkadan sonra ilk ikinci haftasında miyeloid doku görülmeye

başlar. Tek CD45⁺ hücreleri bağ doku ve epitelyum hücrelerine bulunur (Davison ve ark. 2008). Yoğun germinal merkez şekillenmesi 5-7. haftalarda olmaktadır. Germinal merkezde B hücreleri ve makrofajlar bulunur iken T hücreleri germinal merkeze komşu olarak yerleşmiştir (Aytürk 2008; Lillehoj ve Trout 1996).

Peyer Plakları

Tavuklarda jejunumun antimezenterik tarafına yerleşmiştir. İleosekal bağlantısının 5 ile 10 cm yukarısında yer alır (Casteleyn ve ark. 2010). Peyer Plaklarının sayıları, 10 günlük yaşta 1 iken 16 haftalıkta en fazla 6'ya yükselir, en yaşlılarında (58 haftalık) 1 tane bulunur (Befus ve ark. 1980). Barsak lümeninde kalınlaşmış villuslar ve foliküler bir yapı sahip olan Peyer plakları M hücrelerini bulundurur (Kimura 2018). Subepitelyal alanlarda; B hücrelerine bağlı makrofajlar bulunur. İnterfoliküler alanlarda neredeyse tüm T hücreleri ve TCR αβ, ile CD4⁺ çoğunlukta bulunur. Germinal merkez ve interfoliküler alanlarda; çoğunlukla IgY⁺ plazma hücresi ile birkaç IgA⁺ ve IgM⁺ plazma hücreleri bulunur. Epitelin lümeninde IgA⁺ ve IgY⁺ bulurken IgM⁺ yoktur (Davison ve ark. 2008).

Sekal Tonsiller

Sekal tonsiller anatomik olarak her iki sekumun rektuma geçiş duvarının medialine (Casteleyn ve ark. 2010) veya ileosekal bağlantıya yerleşir. Lenfositlerin %45-55'i B hücrelerinden %35'i T hücrelerinden oluşur (Lillehoj ve Lillehoj 2000). Sekal tonsillerin immun sistem hücreleri subepithelyal alanlarda; çoğunlukla chB6⁺, IgM⁺ B hücreleri, IgY⁺ B hücresi, nadir olarak IgM⁺ ve IgA⁺ plazma hücreleri birkaç CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri bulunur (Davison ve ark. 2008). Germinal merkezde; T ve B hücreleri, IgM⁺, IgA⁺, IgY⁺ plazma hücreleri bulunur (Lillehoj ve Trout 1996). Tavukların sekal tonsillerinde özelleşmiş M hücreleri bulunur (Kitagawa ve ark. 2003). Sekal tonsiller kuluçkadan sonra 10. günde kolaylıkla tespit edilebilir. Kanatlılar yaşları ilerledikçe Peyer plakları ve sekal tonsiller daha az belirginleşir ve sayıları azalır (Lillehoj ve Trout 1996).

Bursa Fabricius

Kanatlıların primer lenfoid organı olan bursa Fabricius, esas B lenfositlerinin gelişmesinden ve çoğalmasından sorumludur. Yaklaşık olarak 10.000 lenfatik folikül içerir (Kozuka ve ark. 2010). Antijenlerin alınmasını ve örneklenmesini sağlar. T lenfositlerini bulundurur bu özelliği ile sekonder lenfoid organ olarak görev yapar (Davison ve ark. 2008).

Solunum Sisteminde Mukozal Bağışıklık

Solunum sistemi yoluyla vücuda giren antijenler uzun süreli bir uyarıya ihtiyaç duymadan nonspesifik bağışıklık elemanları tarafından tespit edilir ve yok edilirler (Tamura ve Kurata 2004). Epitel hücreleri antijenleri, patojen tanıma reseptörleri ve Toll benzeri reseptörler ile tespit ederler (Crane ve ark. 2018). Bu hücreler tarafından tanınan antijenler, makrofajlar ve dendritik hücreler aracılığıyla nonspesifik bağışıklığı uyarırlar (Tamura ve Kurata 2004). Nonspesifik bağışıklıkta rolü olan hücreler ve moleküller; fonksiyonlarını tek başlarına yürütebilmelerine rağmen (Diker 2005) makrofaj ve dendritik hücreler tarafından alınıp işlenen antijenler, MHC hücreleri üzerinde solunum sisteminde bulunan lenfoid dokulara; konjunktival lenfoid doku, Harderian bez, nazal lenfoid doku ve bronş ilişkili lenfoid doku sunularak immün yanıtı başlatırlar (De Geus ve ark. 2015).

Kanatlı hayvanların solunum yolu mukozası memelilerden daha az serbest yaşayan makrofajları bulundurmasına rağmen büyük bir makrofaj ve dendritik hücre ağına sahiptir (De Geus ve Vervelde 2013). Kanatlı hayvanların akciğerlerindeki makrofajlar; atriumun epitel alanlarında, tersiyer bronşların infundibulasının epitelinde ayrıca bağ dokusunda bol miktarda bulunur (Smialek ve ark. 2011). Makrofajlar partikülleri uzaklaştırır ve istilacı patojenleri ortadan kaldırılmasında etkin rol oynar (Mutua ve ark. 2016). Kanatlı hayvanlarda, memelilerde bulunan alveolar makrofajlar olmadığından dolayı heterofiller, solunum sistemi savunmasında önemli rol oynar (Fagerland ve Arp 1993). Dendritik hücreler ise nazal boşluklar boyunca yaygındır. Antijenleri ve partikülleri izler çünkü nazal mukozalarda ilk antijen alımını DC'ler gerçekleştirir (Qin ve ark. 2015). Hava yolu DC'leri ise; işledikleri antijenleri doğrudan hava yolu lümenine verir ve böylece lümen yüzeyindeki antijenler sürekli olarak örneklenir (De Geus 2012). DC'ler, IgA sentezlenmesini uyarır (De Geus ve ark. 2015). slgA, antijenlerin invazyon ve kolonizasyonunu engelleyerek mukozal epitel yüzeylerin korunmasında sağlar (Ansari ve ark. 2016). Aynı zamanda slgA, immün yanıtın yayılmasında önemli rol oynar (Fan ve ark. 2015).

Harderian Bez

Kanatlı türleri arasında yerleşim yeri çok az farklılık gösterir. Bazı kanatlı türlerinde, göz küresinin daha çok anteriyoruna yerleşirken, Harderian bez genellikle göz küresinin ventromediyaline ve kasların altındaki periorbital bağdokuya yerleşmiştir (Kozlu ve Altunay 2010). İmmunolojik savunmada önemli bir rolü olan Harderian bezin, temel görevi goblet hü-

releri tarafından mukus ve müsin salgılamasıyla; gözün ve membrana niktisansın yağlanması ve temizlenmesini sağlar (Krunkosky ve ark.2018). Harderian bez; embriyonik dönemin 11. ve 12. günleri arasında konjuktivanın koni şeklindeki epitel hücrelerinden köken alarak gelişir (Maslak 1994). Kanatlılarda Harderian bezin subepitelyal bölgede; plazma hücreleri, interfoliküler bölgelerde; T hücreleri, dendritik hücre benzeri yapılar ve makrofajlar bulunur (Nochi ve ark. 2018). Tek ya da küçük gruplar halinde bulunan CD45⁺ lökositleri; chB6⁺ B hücresi, makrofajlar ve heterofilleri içerir. Harderian bezde bulunan çoğunluktaki T hücreleri; CD4⁺ ve TCR $\alpha\beta_1^+$ ile CD8⁺ TCR $\gamma\delta^+$ T hücreleridir (Davison ve ark. 2008). Plazma hücreleri, embriyonik dönemin 17. gününden başlayarak kuluçka sonrası 30. güne kadar gelişimi devam eder ve plazma hücrelerinin sayısı artar (Maslak 1994). Harderian bezde sentezlenen immunglobulin sınıfları oranıyla ilgili farklı görüşler vardır. Olah ve ark. (1992) Harderian bezde, 8-10 haftalık tavuklarda plazma hücreleri; IgM⁺ ve IgA⁺ çok sayıda iken IgY⁺'nin çok az sayıda olduğunu bildirirken; Ohshima ve Hiramatsu (2002) 5 haftalık tavuklarda IgY⁺ plazma hücresinin, IgM⁺ ve IgA⁺ plazma hücresinden daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. İmmunglobulin sınıfları arasındaki farklı sonuçlara; yaş, çevresel antijenler, stres ya da Harderian bezin hiç uyarılmamış olması, etkili olabilir (Ohshima ve Hiramatsu 2002).

Konjunktival Lenfoid Doku (CALT)

Konjunktival lenfoid doku; tavuklarda (Fix ve Arp 1991) ve hindilerde (Fix ve Arp 1989) alt ve üst göz kapağının kıvrımlarında gözlenmiştir. Tavuklarda germinal merkez kuluçka sonrası 2. haftaya kadar gelişirken, hindilerde kuluçka sonrası 19. güne kadar oluşur (Fix ve Arp 1989,1991). Gözyaşı sıvısında bulunan sitokinler, antimikrobiyal peptitler ve slgA ile beraber ilk savunma hattını oluşturarak mukozal bağışıklıkta önemli rol oynar (Lamichhane ve ark. 2014). Plazma hücreleri kuluçka sonrası 4. haftada gözlenir (Fix ve Arp 1991). Konjunktival lenfoid doku B hücrelerinin yanı sıra önemli bir T hücre popülasyonuna sahiptir. T hücrelerinin yaklaşık %37'si; %16.5 CD4⁺ T hücresi, %6 CD8 β^+ T hücresi, %6 $\gamma\delta^+$ T hücrelerinden oluşur (Van Ginkel ve ark. 2012). Bu T hücre alt grupları, TCR $\alpha\beta_1^+$ T hücreleri, humoral bağışıklıkta rol oynayan; IgA⁺ B hücreleri ile birkaç IgY⁺ ve IgM⁺ B hücresi bulunur (Gurjar 2013).

Nazal Lenfoid Doku (NALT)

Nazal boşlukların mukozalarında bulunan nazal lenfoid doku; tavuklarda septum nasalenin dip kısmı ile her iki koanal yarığın dorsaline dağılan iki lenfoid fo-

likülden oluşur. Kuluçka sonrası oluşan NALT, 7 günlük civcivlerde gözlenir fakat lenfatik yapı olgunlaşmamıştır. 14 günlük civcivlerde lenfoid doku gelişir, lenfositlerin sayısı artar ve sekonder lenfoid foliküller ortaya çıkar. 35 günlük tavuklarda NALT temel gelişimini tamamlar (Kang ve ark. 2013). Ördeklere ise; nazal boşluğun kaudalinde iki çift lenfoid doku vardır. Bir çifti koanal yarığın dorsalinde, diğer çifti septum nasalenin iki tarafında bulunur (Kang ve ark. 2014). Nazal mukozanın savunmasında rol oynayan lenfositler; tavuklarda paranasal (nasolakrimal kanallar, lateral nazal bezler ve onların kanalları) organlara, nazal boşluklara, respiratorik epitel ile olfaktorik bölgelerin nazal mukozasına dağılmıştır (Ohshima ve Hiramatsu 2000). Dağınık lenfoid dokular nazal mukozanın lamina propria ve epitelinde CD8⁺ T hücreleri (Sepahi ve Salinas 2016) ve immunglobulin üreten B hücreleri bulunur. B hücrelerinin çoğunluğunu IgY⁺ hücreleri oluştururken (Nochi ve ark. 2018), IgA⁺ ve IgM⁺ hücreleri daha seyrek. Nazal bezlerin akıtıcı kanallarında ve özellikle oral boşluklarda çok sayıda CD8⁺ T hücreleri bulunurken, sadece birkaç immunglobulin hücreleri vardır. Bu durum NALT'ın bir T hücresi olduğunu ve CD8⁺ T hücrelerinin üst solunum yolları savunmasında önemli rolü olduğunu gösteriyor (Ohshima ve Hiramatsu 2000). Lenfoid hücrelerin geniş alanlara dağılmış olması NALT'ın antijen tanıma ve antijen sunan hücrelerinin daha etkin çalışmasını sağlar (Kang ve ark. 2014). Tavuk NALT'ının lenfoid nodülleri CD4⁺ T hücreleri ile çevrilmiş gelişmiş bir germinal merkezle ve B hücrelerinden oluşur (Ohshima ve Hiramatsu 2000; Sepahi ve Salinas 2016). NALT'ın hücrel immun yanıtta daha etkin olmasını, lenfoid nodülleri kolonize eden CD4⁺ T hücreleri sayısındaki artıştan kaynaklanmaktadır (Krunkosky ve ark. 2018).

Trakea

Kanatlı hayvanlarda trakea gerçek bir lenfoid doku olarak tanımlanmamasına rağmen antijenlere karşı güçlü bir immun yanıt oluşturur (De Geus ve ark. 2012). Özellikle mikoplazma enfeksiyonlarında trakeanın mukozasında CD8⁺ T hücreleri folikül benzeri kümeler oluştururken, CD4⁺ T hücreleri dağınık dağılmıştır (Gaunson ve ark. 2000). Javed ve ark. (2005) aşılanmış ve aşılanmamış tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunda trakea mukozasının bağışıklık yanıtı karşılaştırılmıştır. Aşılanmış tavuklarda IgG⁺ ve IgA⁺ sentezleyen plazma hücrelerinde önemli artışlar gözlenmiştir. Trakeanın diğer lenfoid organlarla bağışıklık yanıtının karşılaştırıldığında farklı sonuçların elde edilmesinin sebebi; trakeadaki mukozal doku miktarının az ve kıkırdak dokusunun

fazla olmasından kaynaklanır (Amarasinghea ve ark. 2018).

Bronş ilişkili Lenfoid Doku (BALT)

Kanatlı hayvanların akciğerleri, iyi organize olmuş lenfoid yapılara ve diffüz dağılmış lenfoid ve miyeloid hücrelere sahiptir (Davison ve ark. 2008). Bu lenfoid doku primer bronşlarda ve sekonder bronşların başlangıcına yerleşmiştir. Hindi ve tavuklarda yerleşim yerleri benzerdir (Fagerland ve Arp 1993). Hindilerde tavuklara göre lenfoid doku daha geniş bir dağılım gösterir (Reese ve ark. 2006). Bronş ilişkili lenfoid dokunun gelişimi yaşa ve antijen uyarımına bağlıdır (Nochi ve ark.2018). Kuluçkadan sonra CD45⁺ lökositleri sayısı artar ve primer bronşa göçü başlar daha sonra sekonder bronşun başlangıcında lenfosit infiltrasyonu başlar (Fagerland ve Arp 1993; Reese ve ark. 2006). Olgun plazma hücreleri ve B lenfositleri ilk kez 2 haftalık yaşta gözlenmiştir. T hücreleri 1 haftalık yaşta BALT epitelinin altında bulunur. CB3⁺ hücreleri 2 haftalık yaşa kadar BALT nodülünde bulunur (Fagerland ve Arp 1993-b). Germinal merkezler, 2-4 haftalık yaşta oluşur ve kanatlı BALT'ının belirgin ve tutarlı bir özelliğidir (Fagerland 1992). CD4⁺ T hücre germinal merkezin parafoliküler kapaklarda bulunur. CB3⁺ B lenfositlerinin dağılımıyla örtüşür. CD8⁺ T hücreleri ise tüm dokulara dağılmıştır (Fagerland ve Arp 1993-b). Germinal merkezde dendritik hücre foliküllerine benzeyen uzun sitoplazmik çıkıntıları olan IgM ve IgY hücreleri bulunur (Reese ve ark. 2006). Lenfoid nodüllerde germinal merkezin bulunması humoral immun yanıtın var olduğunu gösterir (Liu ve ark. 1992). BALT'ın yapısı, farklı epitelyal ve lenfositik bölümleriyle timusu andırır (Fagerland 1992).

Genital Sistemde Mukozal Bağışıklık

Kanatlı hayvanlarda dişi genital organlar ovaryum ile başlar ve oviduct ile devam eder ve kloaka'ya açılarak son bulur (Dursun 2006). Oviduct, yumurta oluşumunun bütün aşamalarının gerçekleştiği önemli bir organ olduğundan dolayı H9N2 avian influenza virüs (Wang ve ark. 2015), avian infeksiyöz bronşit virüs (Nii ve ark. 2015), Newcastle hastalığı virüsü (Rauw ve ark. 2017), *Salmonella* Enteritidis (Anastasiadou ve Michailidis 2016), *Salmonella* Pullorum (Wigley ve ark. 2015) ve *Salmonella* Typhimurium gibi etkenlerin oviduct dokusuna hasar vermesiyle yumurta veriminde düşme, yumurta kabuk yapısı ve kalitesinin bozulması ile kontamine yumurta üretilmesine neden olurlar (Withanage ve ark. 1997). Özellikle kontamine yumurta, insanlarda gıda zehirlenmesine neden olan *Salmonella* Enteritidis enfeksiyonunun ana kaynağıdır. Bu durum büyük bir halk sağlığı

sorununu ortaya çıkarır (Johnston ve ark. 2012). Bu patojen mikroorganizmalar kanatlı yetiştiriciliği endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olmasına rağmen (Withanage ve ark. 1997; Johnston ve ark. 2012; Rauw ve ark. 2017) dış üreme sisteminin enfeksiyonlara karşı bağışıklık mekanizmasına dair çok az çalışma vardır (Davison ve ark. 2008).

Kanatlı hayvanların ovaryum ve oviductunda bulunan lenfoid hücreler ve makrofajların varlığıyla diğer mukozal lenfoid organlardan farklı değildir (Kimijima ve ark. 1990; Withanage ve ark. 2003). Oviductta nonspesifik bağışıklık; Patojen-ilişkili Moleküler Modelleri, Toll Benzeri Reseptörler tarafından antijenlerin tanınmasıyla başlar. Tavuk oviductunda TLR1-2, -2-1, -2-2, -3, -4, -5, -7, -15, -21 üyeleri bulunurken; ovaryumda TLR2-2 dışındaki oviducttaki üyelerin hepsi vardır (Yoshimura 2015). TLR'ler, nükleer faktör κ B ve AP-1(c-Fos ve c-Jun) gibi aktive edilen intraselüler yollar ile sitokin ve kemokin genlerinin transkripsiyonel uyarımını sağlar (Yoshimura 2015; Anastasiadou ve Michailidis 2016). Oviduct ve ovaryumda bulunan önemli sitokinler IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ ve kemokinler CXCL2, CXCL4 (Johnston ve ark. 2012) üyeleri immun sistem hücrelerini antijenin olduğu bölgeye toplayarak hücrel ve humoral bağışıklığı uyarırlar (Wang ve ark. 2015). Hücrel bağışıklıkta önemli rol oynayan T lenfositleri hem ovaryumda hem de oviductta bulunur (Withanage ve ark. 1997). T lenfositleri ilk kez oviductta 5 haftalık yaşta gözlenmiştir. T lenfositleri sayısı; magnum, isthmus ve uterus 15 haftalık yaşta iken infundibulum ve vajinada 19 haftalık yaşta zirveye çıkar (Khan ve ark. 1996). CD4⁺ T lenfositleri çoğunlukla lamina propriasında ve en çok vajinada en az magnum ve isthmusda bulunur (Withanage ve ark. 1997). CD4⁺ T lenfositleri; *Salmonella* gibi hücre içi bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda özel bir öneme sahiptir ve IFN- γ , TNF- α gibi makrofaj aktive edici sitokinleri üreterek etki eder (Withanage ve ark. 2003; Jawale ve Lee 2014). CD8⁺ T lenfositleri çoğunlukla lamina propria, submukoza, muskularis ve subserozaya dağılmıştır ve çok sayıda vajina, ovaryum ve infundibulumda bulunur (Shakya ve ark. 2016). CD8⁺ T lenfositleri oviducttaki viral enfeksiyonlara karşı savunmada önemli rol oynar (Wang ve ark. 2015). Sitotoksik hücrelerin, avian enfeksiyöz bronşit (IB) virüs enfeksiyonunda isthmus ve uterus mukozasında artışıyla proinflatuvar sitokinlerin; IL1 β , IL6, IFN γ ve IL2 üreterek etki eder (Nii ve ark. 2015).

Tavuklarda B lenfositleri ve immunglobulin sınıfları oviductun glandüler ve epitel hücrelerinin yüzeyine yerleşmiştir. IgY⁺ hücreleri infundibulum, isthmus ve uterusun epitel hücreleri ile magnumun

glandüler dokusunda çok sayıda iken IgA⁺ ve IgM⁺ hücrelerinin sayısı magnumun glandüler dokusunda daha fazla olduğunu gözlenmiştir (Kimijima ve ark. 1990). Olgun tavukların ovaryumunda IgA⁺ hücreleri az sayıda iken IgY⁺ hücreleri yoktur. IgM⁺ hücreleri ovaryumun stromasında bulunur (Withanage ve ark. 1997). Bu bulgular oviductun maternal antikorların yumurtaya taşınmasında önemli rol oynadığını gösteriyor. Yumurtanın sarısında IgY⁺, beyazında IgM⁺ ve IgA⁺ hücreleri bulunur (Kimijima ve ark. 1990; Withanage ve ark. 1997; Davison ve ark. 2008). Maternal antikor kuluçkadan yeni çıkan civcivlerin bağışıklık sistemi gelişinceye kadar enfeksiyonlara karşı korur (Rauw ve ark. 2017). *Salmonella* enfeksiyonuna karşı korumada tek başına antikorların varlığı yeterli olmasa da, antikorlar hedef hücreye girmeden önce ve bu patojenin hücreden hücreye yayılması sırasında *Salmonella* ile etkileşime girer. Anti-*Salmonella* antikorları opsonizasyonu sağlar böylece makrofajların bakterileri alımını kolaylaştırır (Jawale ve Lee 2014). Makrofajlar, ovaryum foliküllerinde ve oviductta bulunur en sık infundibulum ve vajinada gözlenmiştir (Davison ve ark. 2008; Yoshimura 2015). Kanatlı hayvanların üreme sisteminde enfeksiyonlara karşı savunmada endokrin sistemin de etkisi vardır (Yoshimura 2015). Erkek üreme sistemi enfeksiyonların oluşmasında ya da vertikal bulaşmada daha az etkilidir (Davison ve ark. 2008).

Teşekkür: Bu derlemede makalesinin hazırlanmasında desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet AKAN'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

- 1- Amarasinghea A, Abdul-Cadera MS, Almatrouk Z, Van Der Meer F, Cork SC, Gomis S, Abdul-Careem MF. (2018). Induction of innate host responses characterized by production of interleukin (IL)-1 β and recruitment of macrophages to the respiratory tract of chickens following infection with infectious bronchitis virus (IBV). *Vet Microbiol*, 215: 1-10
- 2- Anastasiadou M, Michailidis G. (2016). Cytokine activation during embryonic development and in hen ovary and vagina during reproductive age and *Salmonella* infection. *Res Vet Sci*, 109: 86-93
- 3- Ansari AR, GE X-H, Huang H-B, Huang X-Y, Zhao X, Peng K-M, Zhong J-M, Liu H-Z. (2016). Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of Toll-like receptor 4 in the chicken trachea and lung. *Avian Pathol*, 45: 530-537
- 4- Aytürk (Akar) Ü. (2008). Broylerlerde özefageal tonsillerin ışık mikroskopik yapısı (YL.Tezi), SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya
- 5- Befus AD, Johnston N, Leslie G, Bienenstoc J. (1980). Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J Immunol*, 125 : 2626-2632
- 6- Casteleyn C, Doom M, Lambrechts E, Broeck WV, Cornillie PS, Cornillie P. (2010). Location of gut-associated lymphoid tis-

- sue in the 3-month-old chicken: A review. *Avian Pathol.*, 39: 143-150
- 7- Crane MJ, Lee KM, Fitzgerald ES, Jamieson AM. (2018). Surviving deadly lung infections: Innate host tolerance mechanisms in the pulmonary system. *Front. Immunol.*, 9: 1421.
- 8- Çolakoğlu F, Dönmez HH. (2018). Kanatlıların sindirim kanalı lenfoid dokusu. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13:106-111
- 9- Davison F, Kaspers B, Schat K A eds. (2008). *Avian Immunology*. London : Academic Press
- 10- De Geus ED. (2012). Respiratory immune responses in the chicken; Towards development of mucosal avian influenza virus vaccines. [https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/240656]
- 11- De Geus ED, Degen WG, Van Haarlem DA, Schrier C, Broere F, Vervelde L. (2015). Distribution patterns of mucosally applied particles and characterization of the antigen presenting cells. *Avian Pathol.*, 44: 222-229
- 12- De Geus ED, Rebel MJM, Vervelde L. (2012-a). Induction of respiratory immune responses in the chicken; implications for development of mucosal avian influenza virus vaccines. *Vet Q.*, 32: 75-86
- 13- De Geus ED, Vervelde L. (2013). Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. *Dev Comp Immunol.*, 41: 341-351
- 14- Diker S. (2005). *İmmunoloji*. Ankara, Medisan
- 15- Dursun N. ed. (2006). *Evcil Kuşların Anatomisi*. Ankara, Medisan.
- 16- Fagerland JA. (1992). The role of bronchus-associated lymphoid tissue in respiratory immunity of chickens and turkey: morphologic and functional studies. [https://lib.dr.iastate.edu/rtd]
- 17- Fagerland JA, Arp LH. (1993). Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in chickens. *Avian Dis.*, 37: 8-10.
- 18- Fagerland JA, Arp LH. (1993). Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: Age-related differences. *Reg. Immunol.*, 5: 28-36
- 19- Fan X, Liu S, Liu G, Zhao J, Jiao H, Wang X, Son Z. (2015). Vitamin A deficiency impairs mucin expression and suppresses the mucosal immune function of the respiratory tract in chicks. *PLoS One*, 10: e0139131.
- 20- Fix AS, Arp LH. (1989). Conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in normal and *Bordetella avium* infected turkeys. *Vet Pathol.*, 26: 222-230
- 21- Fix AS, Arp LH. (1991). Morphologic characterization of conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in chickens. *Am J Vet Res.*
- 22- Gaunson JE, Philip C, Whithear KG, Browning GF. (2000). Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiology*, 146: 1223-1229
- 23- Gayet R, Bioley G, Rochereau N, Paul S, Cortes B. (2017). Vaccination against *Salmonella* infection: the mucosal way. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 81:e00007-17
- 24- Gurjar RS. (2013). Cell mediated immunity after ocular Ar-type infectious bronchitis virus vaccination. [http://hdl.handle.net/10415/35379]
- 25- Javed MA, Frasca S, JR, Rood D, Cecchini K, Gladd M, Geary SJ, Silbart LK. (2005). Correlates of immune protection in chickens vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* strain GT5 following challenge with pathogenic *M. gallisepticum* strain R (low). *Infect Immun.*, 73: 5410-5419.
- 26- Jawale CV, Lee JH. (2014). An immunogenic *Salmonella* ghost confers protection against internal organ colonization and egg contamination. *Vet Immunol Immunopathol.*, 162: 41-50
- 27- Johnston CE, Hartley C, Salisbury AM, Wigley P. (2012). Immunological Changes at Point-of-Lay Increase Susceptibility to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection in Vaccinated Chickens. *Plos One*, 7: e48195.
- 28- Kaiser P. (2010). Advances in avian immunology-prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.*, 39: 309-324
- 29- Kaiser P. (2012). The long view: a bright, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre-and post-genome. *Avian Pathol.*, 41: 511-518
- 30- Kang H, Yan M, Yu Q, Yang Q. (2013). Characteristics of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal absorption capacity in chicken. *PLoS One*, 8: e84097.
- 31- Kang H, Yan M, Yu Q, Yang Q. (2014). Characterization of nasal cavity-associated lymphoid tissue in ducks. *Anal Rec.*, 297: 916-924
- 32- Khan MZ, Hashimoto Y, Konno A, Kon Y, Iwanaga T. (1996). Development of T-lymphocyte subpopulations in the post-natal chicken oviduct. *Cell Tissue Res.*, 284: 317-325.
- 33- Kimijima T, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kon Y, Sugimura M. (1990). Localization of immunoglobulins in the chicken oviduct. *Nihon Juigaku Zasshi.*, 52: 299-305.
- 34- Kitagawa H, Hosokawa M, Takeuchi T, Yokoyama T, Imagawa T, Uehara M. (2003). The cellular differentiation of M cells from crypt undifferentiated epithelial cells into microvillous epithelial cells in follicle-associated epithelia of chicken cecal tonsils. *J. Vet. Med.*, 65: 171-178.
- 35- Kimura S. (2018). Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anat Sci Int.*, 93: 23-34
- 36- Kozlu T, Altunay H. (2010). Harder Bezi'nin yapısı ve fonksiyonları. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 5: 89-96
- 37- Kozuka Y, Nasu T, Murakami T, Yasuda M. (2010). Comparative studies on the secondary lymphoid tissue areas in the chicken bursa of Fabricius and calf ileal Peyer's patch. *Vet Immunol Immunopathol.*, 133: 190-197
- 38- Krunkosky M, Garcia M, Garza LG, Karpuzoglu BE, Levin J, Williams RJ, Gogal JR RM. (2018). Seeding of the mucosal leukocytes in the HALT and trachea of White Leghorn chickens. *J Immunoassay Immunochem.*, 39: 43-57.
- 39- Kumar S, Chen C, Indugu N, Werlang GO, Singh M, Kim WK, Thippareddi H. (2018). Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens. *Plos One*, 13: e0192450
- 40- Kunisawa J, Kurashima Y, Kiyono H. (2012). Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.*, 64: 523-530.
- 41- Lamichhane A, Azegami T, Kiyono H. (2014). The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.*, 32.
- 42- Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan ICM. (1992). Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today.*, 13: 17-21
- 43- Lillehoj HS, Lillehoj EP. (2000). Avian Coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis.*, 44: 408-425.
- 44- Lillehoj HS, Trout JM. (1996). Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev.*, 349-360.

- 45- Maslak DM. (1994). Head-associated lymphoid tissue [HALT] of the chicken: Characterization of lymphocytes: Iowa State University.
- 46- Mutua MP, Muya S, Gicheru MM. (2016). Protective roles of free avian respiratory macrophages in captive birds. *Biological Research*, 49: 29.
- 47- Nagy N, Olah I. (2007). Ploric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *J. Anat*, 211: 407-411
- 48- Nii T, Isobe N, Yoshimura Y. (2015). The effect of estrogen on the early cytotoxic response to IB virus infection in hen oviduct. *Vet Immunol Immunopathol*, 164: 56-66.
- 49- Nochi T, Jansen CA, Toyomizu M, Van Eden W. (2018). The well-developed mucosal immune systems of birds and mammals allow for similar approaches of mucosal vaccination in both types of animals. *Front Nutr*, 5: 60.
- 50- Ohshima K, Hiramatsu K. (2000). Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chickens. *Histol Histopathol*, 15: 713-720.
- 51- Ohshima K, Hiramatsu K. (2002). Immunohistochemical localization of three different immunoglobulin classes in the Harderian gland of young chickens. *Tissue & Cell*, 34: 129-133.
- 52- Olah I, Scott T, Gallego M, Kendall C, Glick B. (1992). Plasma Cells Expressing Immunoglobulins M and A but Immunoglobulin G Develop an Intimate Relationship with Central Canal Epithelium in the Harderian Gland of the Chicken. *Poult Sci*. 71: 664676.
- 53- Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. (2012). New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine*, 30: 142-154
- 54- Qin T, Yin Y, Wang X, Liu H, Lin J, Yu Q, Yang Q. (2015). Whole inactivated Avian Influenza H9N2 viruses induce nasal sub-mucosal dendritic cells to sample luminal viruses via trans-epithelial dendrites and trigger subsequent DC maturation. *Vaccine*, 33: 1382-1392.
- 55- Rauw F, Nguyen T, Ngabirano E, Marche S, Lambrecht B. (2017). Specific antibody-mediated immunity in the reproductive tract of laying chickens immunized against Newcastle disease with conventional attenuated and inactivated vaccines. *Avian Pathol*, 46: 434-441.
- 56- Reese S, Dalamani G, Kaspers B. (2006). The avian lung-associated immune system: A review. *Vet. Res*, 37: 311-324.
- 57- Saatçi F, Bozkır A. (2003). Aşıların nazal yoldan uygulanışı: *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 3: 32
- 58- Sepahi A, Salinas I. (2016). The evolution of nasal immune systems in vertebrates. *Molecular Immunology*, 69: 131-138.
- 59- Shakya AK, Chowdhury MYE, Tao W, Gill HS. (2016). Mucosal vaccine delivery: Current state and a pediatric perspective. *J Control Release*, 240: 394-413.
- 60- Shira E, Friedman A. (2018). Innate immune functions of avian intestinal epithelial cells: Response to bacterial stimuli and localization of responding cells in the developing avian digestive tract. *PLoS ONE*, 13: e0200393.
- 61- Smialek M, Tykalowski B, Stenzel T, Koncicki A. (2011). Local immunity of the respiratory mucosal system in chickens and turkeys. *Polish J Vet Sci*, 14: 291-297
- 62- Tamura S-I, Kurata T. (2004). Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn. J. Infect. Dis*, 57: 236-247.
- 63- Van Ginkel F, Gulley S, Lammers A, Hoerr F, Gurjar R, Toro H. (2012). Conjunctiva-associated lymphoid tissue in avian mucosal immunity. *Dev Comp Immunol*, 36: 289-297.
- 64- Wang J, Tang C, Wang Q, Li R, Chen Z, Han X, Wang J, Xu X. (2015). Apoptosis induction and release of inflammatory cytokines in the oviduct of egg-laying hens experimentally infected with H9N2 avian influenza virus. *Vet. Microbiol*, 177: 302-314.
- 65- Wigley P, Hulme SD, Powers C, Beal RK, Berchieri A, JR, Smith A, Barrow P. (2005). Infection of the Reproductive Tract and Eggs with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in the Chicken Is Associated with Suppression of Cellular Immunity at Sexual Maturity. *Infect Immun*, 73: 2986-299
- 66- Withanage GS, Sasai K, Fukata T, Miyamoto T, Lillehoj HS, Baba E. (2003). Increased lymphocyte subpopulations and macrophages in the ovaries and oviducts of laying hens infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. 32: 583-590
- 67- Withanage G, Baba E, Sasai K, Fukata T, Kuwamura M, Miyamoto T, Arakawa A. (1997). Localization and Enumeration of T and B Lymphocytes in the Reproductive Tract of Laying Hens. *Poult Sci*, 76: 671-676.
- 68- Yılmaz H, Mutuş R, Minbay A. (1995). Tavuklarda plazma hücrelerinin immunoperoksidaz yöntemi ile belirlenmesi ve lenfoid dokulardaki lokalizasyonu. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1: 282-294
- 69- Yoshimura Y. (2015). Avian Beta-defensins expression for the innate immune system in hen reproductive organs. *Poult Sci*, 94: 804-809.
- 70- Zhao K, Rong G, Hao Y, Yu L, Kang H, Wang X, Wang X, Jin Z, Ren Z, Li Z. (2016). IgA response and protection following nasal vaccination of chickens with Newcastle disease virus DNA vaccine nanoencapsulated with Ag@SiO₂ hollow nanoparticles. *Sci Rep.*, 6: 25720/ DOI:10.1038/srep25720.



Yeterli ve sağlıklı gıda temininde Veteriner Hekimliğin önemi ve Veteriner Kontrol Araştırma Enstitülerinin rolü

Özcan Yıldırım¹, Cevdet Yaralı², Erdem Danyer³

^{1,2,3} Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 31.05.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 04.06.2020

Özet: İklimden ekonomiye, hemen her alanda hızla küreselleşen dünyada, aynı zamanda büyük bir sosyo-kültürel ve sosyo-ekonomik değişim yaşanmaktadır. Artan nüfus ve kentleşme, gıda da israf ve tekelleşme, kaynakların ve kırsal nüfusun azalması, kirlilik, hastalık ve zararlıların artması; yeterli ve sağlıklı gıdaya erişimi, her geçen gün zorlaştırmaktadır. Bu tehdit, tüm toplumların öncelikli sorunlarının başında gelmektedir.

İşte bu süreçte, büyük ferasetle kurulan kurumlara ve tarihsel rollerine ihtiyaç duyuyoruz. Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüleri, bu kurumlarımızdan bazıları olup; bu çalışmamızda Cumhuriyetimizin kuruluş sürecindeki benzer şekilde, en çok gereksinim duyduğumuz gıda güvencesi ve arzındaki rolü hakkında, tarihe yazılı bir not düşmek arzundayız.

Gündemdeki SARS-CoV-2 (Covid-19) küresel salgının bizlere dikte ettiği, "üretimde kendi kendimize yeterlilik" gerçeği; en büyük ev ödevi olarak karşımızda durmaktadır. Bu gerekçelerimiz ve kurumsal rolümüzü, hakkıyla yerine getirme gaye ve gayretini bir kez daha ifade etme adına bu derlemeyi hazırlamış bulunmaktayız.

Anahtar kelimeler: Aşı, gıda güvenliği ve güvencesi, halk sağlığı, veteriner hekimlik, veteriner kontrol enstitüsü

The role of Veterinary Medicine and Veterinary Control Research Institutes in the food security and supply chains

Abstract: World is globalizing rapidly in many areas from climate to economy, nevertheless there is also a great socio-cultural and socio-economic changes. Access to adequate and healthy food makes it difficult every day due to increasing population and urbanization, food waste and monopolization, reduction of resources and rural population, increase of pollution and diseases. This threat is the primary problem of all societies.

In this time, we are seeking institutions and their historical roles which were established with great discernment. Veterinary Control and Research Institutes are some of these institutions. In this study, we want to explain these institute's role in the food security and supply chains when we need them the most.

The fact that the global epidemic dictated us by the SARS-CoV-2 (Covid-19) on the agenda is the "self-sufficiency in production" fact; stands before us as the biggest homework. We have prepared this review in order to once again express our motives and efforts to fulfill our justifications and institutional role.

Key words: Food safety and security, public health, vaccination, veterinary control institute, veterinarian

Giriş

Gıda güvencesi, insanların beslenmesi için gerekli olan gıdanın yeterli üretimi, çiftlikten sofraya kadar güvenli bir şekilde arzı, fiziksel ve ekonomik erişimi ve bu durumun sürdürülebilirliğini temel alan dört ayak üzerine oturmaktadır (FAO, 1996).

Gıda güvencesinin olmayışının başlıca sebepleri kuraklık, sel gibi iklimsel afetler, savaş, ekonomik politikalar kaynaklı kriz ve kıtlıkların yanı sıra; gıda güvencesinin bir parçası olan gıda sağlığı ve güvenliğinin yeterince sağlanamamasına bağlı sorunlardır. Örneğin tarihsel süreçte sığır vebası, şap gibi viral pandemiler hayvansal gıdaya ulaşımı önemli ölçüde sınırlamıştır.

İnsanın sağlıklı bir şekilde yaşamını sürdürebilmesi; yeterli, dengeli ve sağlıklı gıda ile beslenmesiyle mümkündür. Vücut tarafından sentezlenemeyen, ancak beslenme ile dışarıdan alınması gereken esansiyel aminoasitler olarak adlandırılan aminoasitlerin dengeli bir şekilde alınabilmesi için hayvansal kökenli proteinlerin tüketilmesi zorunludur. Hayvansal proteinlerin biyolojik değerliliği bitkisel kaynaklı gıdalara göre çok daha yüksektir. Ayrıca, vücuda emilimi, kullanımı ve yararlanması açısından hayvansal gıdalar insana en uygun kompozisyonda bulunmaktadır.

Gıda güvencesi, yani "gıda arzı kapasitesi", moda tabirle "nükleer güç ile eşdeğer" değer, mevcut

en büyük güçtür. Konu temel olarak üç başlık altında incelenecektir.

1. Gıda Güvencesinde Veteriner Hekimlik

Gıda güvencesi kapsamında, hayvansal gıdaların yeterli ve ekonomik üretiminde veteriner hekimlik, çok önemli rol almaktadır. Çiftlik hayvanlarında ıslah faaliyetleri, hayvanlarda yeterli ve dengeli besleme ve hayvan refahıyla verimlilik artırılmaktadır. Verimlilikle birlikte, başta aşılama olmak üzere koruyucu hekimlikle sağlanan birey ve sürü sağlığı ve sürü yönetimiyle, yeterli ve sürdürülebilir hayvansal gıda üretimi sağlanabilmektedir.

Veteriner Hekimlik faaliyetleri, iyi tanımlanarak planlanmış kurumsal bir organizasyon eşliğinde hayvan sağlığı ve halk sağlığını koruyarak ve gıda güvencesini sağlayarak, aynı zamanda bir ekonomik faaliyet olması hasebiyle de hayvansal üretimin verimliliğini yükselterek bir katma değer artışı sağlamaktadır.

Bir toplumda gerçek anlamda gıda güvencesinden bahsetmek "kendi kendine yeterlilik" ile mümkündür. Günümüz koşullarında kendi kendine yeterlilik, sınırlı sayıda ve tekelleşen oluşumlarla değil; ancak kamunun desteği ve hakemliğinde, aile çiftçiliğinin etkin şekilde varlığını sürdürebilmesi ile mümkün olabilecektir.

Aile çiftçiliği, başka bir deyişle; "tüm yumurtaları aynı sepete koymama", bir ihtiyat stratejisidir. Ülkemiz, sahip olduğu iklimsel ve coğrafi çeşitlilik, yani diğer bir ifadeyle onlarca farklı havzaya sahip oluşu ile üretimde çeşitliliği ve sürekliliği sağlamada büyük bir avantaja sahiptir. Olası ambargo, kıtlık, doğal afet, ekonomik krizlerde üretim yapan on binlerce aile çiftliği, kendi kendine yeterliliğinin en büyük ispatı ve can simididir. Dünya genelinde ticarete konu olan gıdaların sevk ve idaresi büyük oranda tekelleşme yoluyla yönetiliyorsa da toplumların temel gıda ihtiyaçlarının %80'i halen aile çiftçiliğine bağlı olarak sağlanabilmektedir (FAO-IFAD 2019).

Günümüzde, aile çiftçiliğinin sürdürülebilirliği için sağlanacak kamu gücünün etkin desteği, gerçek anlamda veteriner hekimlik organizasyonunun varlığı, yetkinliği ve desteği ile mümkün olacaktır. *Örneğin üretim planlaması, hedeflenen verimlilik artışı, pazarlama stratejisi, birey ve sürü sağlığı, sürü yönetimi, kayıt sistemleri, izlenebilirlik, sağlıklı birincil ve ikincil ürün üretimi, koruyucu hekimlik faaliyetleri gibi çok önemli süreçler, ancak iyi bir kamu ve sivil toplum kuruluşu birlikteliğiyle sağlanabilmektedir.*

Bugün, küresel boyuttaki tekelleşme nedeniyle gıda arzının bireysel çabalarla sağlanabilmesi müm-

kün görünmemektedir. Ancak kamu otoritesi organizasyonu ile sahip olunan kurumsal varlıkların oluşturulması ve gücüyle mümkün olabilmektedir.

Büyük ekonomik ve siyasi krizler, küresel salgınlar ve doğal afetler göstermiştir ki başta gıda güvencesi ve sağlık gibi alanlar olmak üzere, stratejik sektörlerin kamu veya kamu ortaklığı ile yürütülmesi bir zorunluluktur. Geçmişte bu politikaları tamamen terk eden ülkelerin ise bu alanlarda hızla, en azından ortaklıkla kamulaştırmaya gittiği görülmektedir. Bunu yapamayan ülkeler ise çok uluslu küresel şirketlere tam bağımlı hale gelmişlerdir.

Toplumların gıda güvencesinde veteriner hekimlik, çok önemli görevler üstlenmektedir. Veteriner hekimlerin bireysel yeterlilik ve yetkinliği ile bunun pozitif bir kuvvete dönüştürülmesi, bağımsız ve tanımları, stratejileri, planlamaları çok iyi yapılmış kurumsal bir teşkilat ile mümkün olabilecektir. Tüm bu gerekçelerle, veteriner hekimlik mesleği ve kurumsal organizasyonları, büyük önem arz etmektedir.

2. Gıda Güvenliğinde Veteriner Hekimlik

Gıda güvenliği, gıda güvencesinin en önemli ayağıdır. Bu nedenle gıdaların her türlü üretim aşaması, nakliyesi, depolanması, kontrolü ve son tüketiciye kadar sunulması sürecinde, gıda kaynaklı rahatsızlıklara ya da hastalıklara sebep olan fiziksel, biyolojik ve kimyasal nitelikteki çeşitli risk unsurlarını önleyecek, zarsız kılacak ya da ortadan kaldıracak yaklaşımları içeren bir kavram olarak tanımlanmaktadır.

Gıda güvenliğinin temeli, sağlıklı gıda arzıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sağlıklı gıdayı özetle, beş temel prensiple izah etmektedir. Bunlar:

- Gıdaları insanlar, hayvanlar ve biyolojik ajanların neden olduğu kirlilikten korumak.
- Pişirilmiş gıdalardaki kirliliği önlemek için, çiğ ve pişmiş gıdaların birbirine temasını engellemek.
- Patojenleri yok etmek için, gıdaları uygun sıcaklıkta ve uygun sürede pişirmek.
- Gıdaları uygun sıcaklıkta saklamak.
- Ham maddeleri ve suyu korumak.

"Çiftlikten çatala gıda güvenliği", ifadesi bu kavramı kısaca özetlemektedir. Çiftlikten çatala gıda arzı zincirinde, veteriner hekimlik ve kurumsal organizasyonu hayati rol oynamaktadır. Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) Ofisinin tespitiyle, zoonoz kavramı, hayvan ve/veya hayvansal kökenli gıdalardan insana, insandan hayvana bulaşabilen hastalıklar olarak tanımlanmaktadır ve insanlarda bulaşıcı hastalıkların yaklaşık %60'ı, yeni ortaya çıkan bula-

şıcı hastalıkların yaklaşık %75'i zoonoz hastalıklardır (UNEP 2016).

Kuduz, şarbon, bruselloz, tularemi, kistik ekinokokkozis, toksoplazmoz, zoonotik tüberküloz, salmonelloz gibi zoonozlar eskiden beri bilinen hastalıklardır. Son 15-20 yılda bu enfeksiyonların yanı sıra, zoonotik karakterli yeni enfeksiyonlar ortaya çıkmış ve etkileri her an devam etmektedir. Bunların başında, Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu-2 (SARS-CoV-2, Covid-19), Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS), Ebola Virus Hastalığı, Batı Nil Virüsü Enfeksiyonu, Avian influenza (kuş gribi), Domuz Gribi, Deli Dana Hastalığı (BSE), Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS), Zika Virus Hastalığı (ZVH), Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi vs. gibi hastalıklar ilk akla gelen zoonozlardır. Bu kadar çok fazla riskin olduğu hayvansal gıda üretiminde, sağlıklı gıda arzı, tüm insanlık için hayati önem arz etmektedir.

Sağlıklı üretimin birinci yolu koruyucu hekimliktir. Veteriner hekimlik mesleği, hayvan refahına yönelik hizmetleri, hastalık teşhisi, analizi ve tedavisi, sağlıklı beslenme, beslenme hastalıklarının tedavisi, mera yönetimi, korunması ve ıslahı, reproduksiyon ve suni tohumlama ile sağlıklı üreme faaliyetleri, koruyucu aşılamalar, bilimsel sürü yönetimi, işletme, kesimhane ve hayvansal ürün işleme tesislerinde denetim, kayıt ve kontrolleri ile verimli ve sağlıklı hayvan ve dolayısıyla güvenli gıda üretiminin gerçekleştirilmesinde çok önemli görevler üstlenmektedir.

3. Veteriner Kontrol Araştırma Enstitülerinin Rolü

Ülkemizde veteriner hekimlik mesleğinin eğitimi, dünya ile başat bir şekilde 1842 yılından beri sürdürülmektedir (Beşe 1981). İlk veteriner mektebi 1849 yılında Osmanlı Hükümeti zamanında açılmıştır (Bekman 1940). Bu durum, mesleği, kurumsallaşma ve bilimsel değer üretme anlamında çok avantajlı kılmış ve 178 yıldır toplumumuza gıda güvencesi ve sağlıklı gıda arzında hizmet veren bir meslek haline dönüştürmüştür.

1900'lü yıllarda büyük bir ferasetle kurulmaya başlanan *Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüleri*, savaşta, salgın afetlerinde ve bu ülkenin Kurtuluş Savaşı sürecinde hayati rol oynamıştır (Bekman 1940). Bu yılların başında kuduz aşısı üretilmiş, dünyayı kasıp kavuran sığır vebasına karşı anti-serum ve ardı sıra sığır vebası aşısı bulunarak, hastalıkla mücadelede başarılı olunmuştur. Devam eden yıllarda şap, şarbon, brusella, mavidil, koyun-keçi vebası, koyun-keçi çiçek aşısı, kanatlı aşıları vs. başta olmak üzere onlarca hastalığa karşı aşı, anti serum ve biyolojik test kitleri üretilmiştir (Çizmen 1960; Özsoy 1962, 1964, 1967).

O dönemlerde yetişen, *Mehmet Akif Ersoy, Ziya Gökalp, Selahattin Batu, Mehmet Turan Yazar, Kemal Cemil, Süreyya Tahsin Aygün, Osman Nuri Koçtürk, Adil Mustafa Şehzadebaşı, Ahmet Şefik Kolaylı* ve daha nice meslek büyükleri; tarihsel süreçte sağladıkları toplumsal yarar, halk sağlığı, gıda güvenliği ve gıda güvencesinde; isimleri, toplumsal hafızada mütevazı bir şekilde yer edinmiştir. Bu üstatlarımız ve daha ismini anamadığımız nice meslek büyüklerinin ayrı ayrı hikâyeleri var. Sadece, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsünün de kurucusu olan Ahmet Şefik Kolaylı için yazılan bir anekdotu örnek vermek, yeterli diye düşünüyoruz:

Balkan savaşı sırasında askerlerin beslenmesi bozuk ve özellikle proteince yetersizdir. Öte yandan, sığır vebası hayvanlar arasında salgın halindeydi. Hastalığa yakalanan sığırlara bir şey yapılamıyor ve bunlardan yararlanılamıyordu. Sığır vebasının insanda hastalık yapmadığını bilen genç Veteriner Teğmen Şefik hastalanan hayvanların kesilmesini ve bunların etlerinin kavrularak askere yedirilmesini teklif etti. Bu öneri, hasta hayvan etinin insanlara yedirilemeyeceği itirazıyla reddedildi. Bunun üzerine genç veteriner, " Bu hayvanları yiyen tek bir insanda hastalık çıkarsa beni kurşuna dizin " diye diretti ve önerisini kabul ettirdi. Böylece askerlerin protein ihtiyacı karşılandı. Edirne'nin Bulgarlardan kurtarılmasında bu direnişin hiç etkisi olmadığını kimse öne süremez (Unat 1976).

Ülkemizde, mevcut durumda birisi şap hastalığı konusunda ihtisaslaşmış olmak üzere, toplamda dokuz veteriner kontrol araştırma enstitüsü bulunmaktadır. Kuruluşlarından beri çeşitli reorganizasyonlar geçirmekle beraber bu kurumlarımız, günümüze kadar taşıdıkları tarihsel hafızaları ve kısıtlı imkânlarıyla, görevlerini yerine getirmeye devam etmektedir. Bu enstitülerimiz, *Ankara, İstanbul, İzmir, Erzurum, Samsun, Konya, Adana ve Elazığ illerinde olmak üzere, sekiz coğrafi bölgeye stratejik olarak konumlanmış ve yetkilendirilmişlerdir* (TOB 2020).

Enstitülerimizin dört temel görevi bulunmaktadır:

1. Araştırma-Geliştirme (Ar-Ge) görevleri: Hayvan sağlığı, halk sağlığı ve çevre sağlığı halkasında araştırma ve geliştirme faaliyetlerinde bulunmak.
2. Teşhis ve kontrol hizmetleri: Teşhis, test, analiz, muayene, nekropsi ve diğer teşhis hizmetlerini yürütmek.
3. Eğitim Faaliyetleri: Ulusal ve uluslararası eğitim faaliyetlerini yapmak ve organize etmek.
4. Üretim (Aşı, anti serum ve biyolojik test kitleri üretimi): Ülkemiz ihtiyacı olan bulaşıcı ve salgınlara karşı aşı ve anti serum üretimi ve teşhis hizmet-

lerinde kullanılan alerjenlerin ve kitlerin üretimi gerçekleştirilmek.

Enstitülerimiz konumları itibariyle, hızlı müdahale ve kolay ulaşılabilirlik açısından, bölgesel olarak hizmet vermelerinin yanı sıra, bazı enstitüler altyapıları dâhilinde, ulusal ve/veya uluslararası hastalık ve/veya konu referanslığı görevlerini de üstlenmişlerdir.

Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü kuruluşundan itibaren gıda maddelerinin kontrolü konusunda da hizmet vermektedir (Çizmen 1960). Burada başta hayvansal gıda maddeleri olmak üzere çeşitli gıda maddelerinin ve içme sularının mikrobiyolojik muayeneleri Uluslararası Standartlar Teşkilâtı (ISO), Türk Standartları Enstitüsü (TSE) ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) metotları vb. uluslararası geçerliliği olan metotlarla yapılmaktadır. Kuduz ve leptospirozis gibi hastalıkların teşhisleri konusunda Sağlık Bakanlığı'na da hizmet vermekte, genetik ve doping kontrolü gibi alanlarda hem ulusal hem de uluslararası düzeyde analiz hizmetleri yürütmektedir.

3.1. Veteriner Hekimler, gıda güvencesinde birer Uç Beyliği'dir.

Gerek kamuda gerekse özel mesleki icra alanında; ülkenin en ücra köşelerine kadar hizmetleri götüren bir organizasyona sahip meslek; hiç şüphesiz veteriner hekimliğidir. Ülkenin her noktasında var olan bu meslek; icra makamlarının, eylem planlarını gerçekleştirmesinde de çok önemli görevler üstlenmektedir.

Enstitüler, bir nevi *uç beyliği* olan sahadaki kamu ve serbest veteriner hekimlerin hastalık ve zararlılar ile mücadelesinde karşılaştığı her türlü sorunun çözümünde, ihtisas ve referans noktalarıdır. Sahadan gelen numuneler, en modern metotlarla incelenerek mücadele stratejileriyle birlikte raporlanmaktadır. İhtiyaç olması durumunda, sahaya derhal uzman desteği sağlanmaktadır. Bilindiği üzere, bulaşıcı ve salgın hastalıklarda tedavi her zaman mümkün olmadığı gibi ekonomik bir seçenekte olmayabilmektedir. Özellikle kitlesel sürü sağlığında, koruyucu hekimlik; en akılcı, kestirme ve ekonomik yoldur. Yüzyılı aşkın bilgi, tecrübe birikimi ve kurumsal hafızaları ile Enstitülerimiz, Türkiye'nin ihtiyaç duyduğu aşı, anti-serum ve biyolojik ürünleri üretmeye yine yüz yılı aşkın bir süredir devam etmektedir.

3.2. Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüleri, sağlıklı gıda arzı sürecinde, birer tahmin ve erken uyarı merkezleridir

Küresel iklim değişikliği, ulaşımın kolaylaşması ile artan insan, hayvan ve ürün-hammadde hareket-

leriyle son yıllarda vektör (kene, sinek, bit, pire vb.) ve yabani hayvanlarla hastalıkların da bir yerden bir yere bulaşması kolaylaşmıştır (Hacıoğlu 2017). Bu hastalıklara örnek olarak, hanta virüs, mavidil, zika, batı nil virüsü, Kırım-Kongo kanamalı ateşi, akabane, afrika at vebası, sıtma, veba, tularemi, Lyme verilebilir. Bu hastalıklarla mücadelede erken teşhis, yayılma durumlarının tespiti ve izlenmesi son derece önemlidir. Enstitülerimizce yürütülen projelerle, vektörel hastalıklarla mücadele için ülke genelinde birçok bölgeye kurulan sinek tuzaklarıyla ve buralardan düzenli alınan numunelerin incelenmesiyle, bu biyolojik ajanların ülkemizde olup olmadığı tespit edilebilmektedir. Yaban hayatından çiftlik hayvanlarına ve insanlara bulaşabilen birçok hastalık, yine enstitülerimiz tarafından izlenmektedir. Enstitülerimiz, bu tespitleriyle; tedbir alma adına birer tahmin ve erken uyarı merkezleridir.

Bakanlığın, uzman veteriner hekimlerin tespit ve önerileri doğrultusunda belirlediği politikalar dâhilinde, klinik ve/veya sero-surveylerle tarama yapılarak hastalıkların varlığı ve seyri takip edilmektedir. Hayvansal gıda üretiminin başlıca kaynakları olan sığır, koyun ve kanatlı yetiştiriciliğinde sürü taramaları, koruyucu hekimliğin erken uyarı rolüyle, çok büyük bir başarıya olup, işletme ve dolayısıyla ülke ekonomisine önemli katkılar sağlanmaktadır.

Sahada seyreden hastalık etkenlerinin, modern metotlarla izolasyonu ve identifikasyonu yapılarak, teşhis konulmakta ve hastalık mücadelesi en etkili şekilde yapılabilmektedir. Özellikle viral etkenlerde, virüslerin gen dizilemesi ve filogenetik analizleri yapılarak, hızlıca aşı veya anti serum üretimi yapılmakta ve bunların geliştirilmesine çalışılmaktadır. Örneğin, çok sayıda serotipe sahip şap virüsü, mavidil virüsü, Newcastle virüsü, avian influenza virusu vs. gibi bazı hastalıklarla mücadelede, bu alt tiplerinde belirlenmesi gerekmektedir.

3.3. Veteriner hekimlik ve özelinde de Enstitülerimiz, gıda arzında; "çiftlikten çatala" yolculuğunun tüm zincirinde vardır ve olmak zorundadır

Veteriner hekimlik, eğitim altyapısının ve kurumsal organizasyonunun gücü oranında ve bu organizasyon içerisinde de tarihsel hafızaları ile varlığını sürdürecektir olan Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüleri; *yeterli ve sağlıklı gıda temininde, "güçlü toplum" ve "güçlü devlet" in temel dinamiklerinden birisi olarak, görevlerini sürdürmeye devam edecektir.*

İfade edilen bilgiler ışığında, bugün Dünya'da karşı karşıya kalınan en büyük problemler aşağıda özetlenmiştir.

a. İklim değişikliği: İnsanoğlunun bitmek tükenmek bilmeyen hırsı ve tüketim çılgınlığı, dünyayı çok ciddi çevresel ve atmosferik kirliliğe maruz bırakmıştır. Bu kirlilik ve sınırlı olan doğal kaynakların hızla tüketilmesi, beraberinde ekolojik dengenin alt üst olmasına neden olmuş; buna bağlı olarak kuraklık, sel felaketleri, susuzluk ve küresel ısınma gibi iklim değişiklikleriyle, gıda arzı ve güvenliği; yakından ve derinden etkilenmiştir.

b. Vektörel hastalıkların yayılışı: İklim değişikliğine ve küresel ısınmaya bağlı olarak birçok ölümcül hastalığı insandan insana veya hayvandan insana bulaştıran ve vektör olarak tanımlanan canlıların (sivrisinekler ve keneler başta olmak üzere) yaşam alanları değişmiş ve genişlemiştir. Bu durumda beraberinde taşıdıkları hastalıkların yayılma alanları da genişlemiş, daha öncesinde görülmeyen bölgelerde de görünür hale gelmiştir.

c. Antibiyotiklere karşı direnç oluşumu: Bilinçsiz ve aşırı kullanımın bir sonucu olarak günümüzde, mevcut antibiyotiklerin hemen hemen hepsine karşı direnç gelişimi meydana gelmiştir. Bu durum, bakteriyel hastalıklara karşı elimizdeki en büyük silah olan antibiyotiklerin, gücünün azalmasına neden olmaktadır.

d. Kitlesele insan göçleri: İnsanoğlu elindeki güçle, enerji kaynaklarını ve yeraltı-yerüstü zenginlikleri kontrol etme çabası uğruna, dünyanın birçok noktasında dramatik insani felaketlerin yaşanmasına yol açmıştır. Ekonomik, siyasal, siber, biyolojik, konvansiyonel, terör, doğrudan veya vekâlet savaşları şeklinde görülen bu mücadeleler; jeopolitik noktada bulunan ülkemizi, yakinen ve çoğu zaman doğrudan etkilemektedir. Kitlesele göç, bu insani felaketlerin sonuçlarından sadece birisi olup, ülkemiz buna her zaman hazır olmak zorundadır.

Sonuç

Artık dünyada savaşlar farklı boyutlara evrilmektedir. Özellikle biyolojik silahlar, yakın gelecekte en çok konuşulan tehdit unsurlarının başında yer alacak gibi görünmektedir. Çünkü kitlesele imha ve nükleer silahlar, günümüzde birçok ülkenin elinde bulduğundan ve karşılıklı güçler dengesi olarak caydırıcılığı bulunmaktadır.

Türkiye; Afrika, Avrupa ve Asya kıtalarının kavşak noktasında yer almakta ve bu üç kıtanın arasında köprü konumunda bulunmaktadır. Bu nedenle de

birçok avantaja sahip olduğu gibi birçok dezavantaja da sahiptir. Ülkemiz, bu risklerin bilinci ile bölgesinde her zaman, her alanda güçlü ve dinamik bir ülke olmak zorundadır.

Gıda güvenliğini, halk ve hayvan sağlığını tehdit eden biyolojik felaketlere, saldırılara ve hastalıklara karşı en etkin tedbir üretebilecek kuruluşlardan birisi de *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüleridir*. Zira bu kuruluşlarımız, *biyolojik ajan, biyolojik tehdit, biyo-güvenlik, biyo-emniyet* gibi kavramları yakından bilen ve bu disiplinle çalışan önemli kurumlarımızdır.

SARS-CoV-2 (Covid-19) salgını Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitülerimizin sağlık ve gıda alanlarındaki stratejik önemini gözler önüne sermiştir. Tüm bu gelişmeler ve bilgiler göz önünde bulundurularak, Enstitülerimizin faaliyet alanları dikkate alınmalı, eksikleri hızla tamamlanmalı ve altyapıları yukarıda arz edilen hususlara en iyi cevap verebilecek şekilde iyileştirilmelidir.

Kaynaklar

1. Bekman M. (1940) *Bakteriyoloji enstitülerinin tavazzuhu* (İçinde: Veteriner Tarihi), Ankara Basım ve Cildevi, Ankara, 188-198.
2. Beşe M. (1981) *Atatürk'ün 100. Doğum yıldönümünde Türk veteriner Hekimliğinin gelişmesine kısa bir bakış*, İstanbul, Evrim Ofset, 120.
3. Çizmen F. (1960) Dergimiz ve Enstitümüz Hakkında birkaç söz, *Etlük Veteriner Bakteriyoloji Dergisi*, Cilt:1 Sayı: 1, 3-9.
4. FAO (1996). Rome Declaration on food Security and World Food Summit Plan of Action, FAO, Rome.
5. FAO and IFAD. (2019) United Nations Decade of Family Farming 2019-2028. Global Action Plan. FAO and IFAD, Rome.
6. Hacıoğlu S, Dincer E, Isler CT, Karapınar Z, Ataseven VS, Özkul A, Ergunay K. (2017) A snapshot avian surveillance reveals West Nile virus and evidence of wild birds participating in Toscana virus circulation. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(10), 698-708. DOI: 10.1089/vbz.2017.2138
7. Özsoy A. (1962) Etlük Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsünün 1962 yılı Çalışmaları Hakk'ında, *Etlük Veteriner Bakteriyoloji Dergisi*, Cilt:1 Sayı: 6,427-441.
8. Özsoy A. (1964) Etlük Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsünün 1964 yılı Çalışmaları Hakk'ında, *Etlük Veteriner Bakteriyoloji Dergisi*, Cilt:2 Sayı: 3-4,137-156.
9. Özsoy A. (1967) Etlük Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsünün 1967 yılı Çalışmaları Hakk'ında, *Etlük Veteriner Bakteriyoloji Dergisi*, Cilt:3 Sayı: 3-4,137-156.
10. Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB) (2020) <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/> Erişim Tarihi: 29.05.2020.
11. Unat E.K. (1976) 18 Şubat 1976 Milliyet Gazetesi, Prof. Dr. Ekrem Kadri <http://gazetearsivi.milliyet.com.tr/Arsiv/1976/02/18> Erişim Tarihi: 29.05.2020.
12. UNEP (2016). UNEP Frontiers 2016 Report: *Emerging Issues of Environmental Concern*. United Nations Environment Programme, Nairobi.

