

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 32 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2021

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Cilt/Volume 32 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2021

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 • e-ISSN 2717-8099

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 YILDIRIM, Turkey

Editör / Editor in Chief

Dr. Erdem DANYER, Turkey

Dr. Selçuk PEKKAYA, Turkey

Dil Editörleri / Copy Editors

Dr. Yeliz YIKILMAZ, Turkey

Dr. F. İpek KESKİN, Turkey

Bilimsel Kurul* / Editorial Board

Dr. Erhan AKÇAY, Turkey

Dr. Özlem ALTINTAŞ, Turkey

Dr. Ali ERKURT, Turkey

Dr. Sabri HACIOĞLU, Turkey

Uzm. Yusuf Ziya KAPLAN, Turkey

Uzm. Bahadır KILINÇ, Turkey

Çağla KORKMAZ, Turkey

Doç. Dr. Burhan TOPRAK, Turkey

Neslihan Akbulut TOSUN, Turkey

* Kurullar soyada göre alfabetik dizilmiştir
Boards are listed alphabetically by surname

Danışma Kurulu / Advisory Board

Ertan AĞTÜRK, Foot and Mouth Disease Inst., Turkey

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU, Pendik Vet. Cont. Inst., Turkey

İsmail AYDIN, Samsun Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Martin BACHMANN, Martin Luther Uni., Germany

Prof. Dr. Tanay BİLAL, İstanbul Uni., Turkey

Dr. Erdim Ozan ÇAKIR, Pendik Vet. Cont. Inst., Turkey

Doç. Dr. Fethiye ÇÖVEN, Bornova Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Müge DOĞAN, Konya Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Aysel EKİNCİ, Vet. Cont. Inst., Turkey

Yasemin ERDOĞAN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Ufuk EROL, Cumhuriyet Uni., Turkey

Dr. Yasin GÜLCÜ, Konya Vet. Cont. Inst., Turkey

Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ, Ondokuz Mayıs Uni., Turkey

Prof. Dr. Murat GÜZEL, Ondokuz Mayıs Uni., Turkey

Bünyamin İREHAN, Elazığ Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Günel İSMAİLOVA, Independent Consultant, Italy

Dr. Hamza KADI, Samsun Vet. Cont. Inst., Turkey

Mehmet KARAKAYA, Foot and Mouth Disease, Turkey

Ünal KILIÇ, Elazığ Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Emre OZAN, Ondokuz Mayıs Uni., Turkey

Dr. Ediz Kağan ÖZGEN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Giulia RONCON, Utrecht Uni., The Netherlands

Dr. Fahriye SARAÇ, Pendik Vet. Cont. Inst., Turkey

Osman SEZER, Adana Vet. Cont. Inst., Turkey

Mehmet Ali SÖZMEN, Adana Vet. Cont. Inst., Turkey

Dr. Özhan TÜRKYILMAZ, Bornova Vet. Cont. Inst., Turkey

Prof. Dr. A.Erdem ÜTÜK, Çukurova Uni., Turkey

Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Uni., Turkey

Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Uni., Turkey

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>

Hakem Listesi* / *Reviewer List*

Prof. Dr. Ayşen ALTINER	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Biyokimya AD. Türkiye
Doç. Dr. Zeki ARAS	Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN	Hatay Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Adnan AYAN	Van yüzüncü Yıl Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Mehmet Fatih AYDIN	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üyesi Orkun BABACAN	Balıkesir Üniv. Kepsut Meslek Yüksek Okulu Veterinerlik Bölümü, Türkiye
Dr. Öğretim Üyesi Gülbahar BÖYÜK	Ankara Medipol Üniv. Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Türkiye
Prof. Dr. Oya BULUT	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Fatih BÜYÜK	Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Seyda CENGİZ	Atatürk Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üyesi Nüvit COŞKUN	Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doçent Dr. Abdullah DİKİCİ	Uşak Üniv. Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Teknolojisi AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üyesi Fırat DOĞAN	Hatay Mustafa Kemal Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üyesi Ahmet Edem DÖNMEZ	Mersin Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar AD. Türkiye
Prof. Dr. Hüseyin ESECELİ	Bandırma On yedi Eylül Üniv. Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme Bilimleri AD. Türkiye
Dr. Öğretim Üyesi Ufuk EROL	Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Tülin Güven GÖKMEEN	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN	Kastamonu Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Sabri HACIOĞLU	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Viral Teşhis Lab. Türkiye
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	Aydın Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Şebnem PAMUK	Afyon Kocatepe Üniv. Veteriner Fak. Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Böl. Türkiye
Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD. Türkiye
Dr. Ümmü Sena SARI	29 Mayıs Devlet Hastanesi, Türkiye
Prof. Dr. Serpil SARIOZKAN	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni tohumlama AD. Türkiye
Prof. Dr. Serap SAVAŞAN	Aydın Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Zafer SAYIN	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. SERMET SEZİGEN	Sağlık Bilimleri Üniv. Savunma Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye
Prof. Dr. Umut TAŞDEMİR	Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni tohumlama AD. Türkiye
Prof. Dr. Şükrü TONBAK	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY	Muğla Sıtkı Koçman Üniv. Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Böl. Hast. AD. Türkiye
Prof. Dr. Amağan Erdem ÜTÜK	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Orhan YAVUZ	Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD. Türkiye

** 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, EBSCO, CAB Abstracts, AGRIS gibi ulusal ve uluslararası veri tabanları kapsamında dizinlenen DergiPark'da ücretsiz olarak açık erişimi bulunan, "en az çift kör hakemli" bir dergidir. Yazım kuralları ve HYPERLINK "<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd/indexes>" derginin indekslendiği güncel veri tabanları hakkında bilgiye internet sitesinden ulaşabilirsiniz.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is a free-open access journal, that evaluated by at least double-blind reviewers; indexing in the scope of national and international databases like, ULAKBİM life sciences, Turkish citation index, CAB abstracts and published on DergiPark system. HYPERLINK "<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd/indexes>" You can find more information about instruction for authors and the updated databases in which the journal is indexed, from the journal website.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2021, Her hakkı saklıdır. / *All rights reserved.*
Basım Tarihi / *Publishing Date*: Aralık / *December* 2021, 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 medisan yayinevi@gmail.com

İçindekiler / Contents

Original Article / Özgün Araştırma

- The assessment of the protein profiles and oxidant/antioxidant status in conjunctival *Brucella melitensis* Rev.1 vaccinated sheep**
 Konjunktival *Brucella melitensis* Rev.1 ile aşılanmış koyunlarda protein profillerinin ve oksidan/antioksidan durumunun değerlendirilmesi
 Gülay Çiftci, Alper Çiftci 101
- Aflatoxin M₁ contamination of Anatolian Water Buffalo milk**
 Anadolu Manda sütünde Aflatoksin M₁ kontaminasyonu
 Tahsin Onur Kevenk 107
- Genetic analysis of Canine adenovirus type 2 strains circulating in Turkey from past to present**
 Geçmişten günümüze Türkiye’de sirküle olan Canine adenovirus tip 2 suşlarının genetik incelemesi
 Fahriye Sarac, Veli Gulyaz, Mustafa Hasoksuz, Serdar Uzar, İrem Gulacti, Esra Satir,
 Pelin Tuncer-Göktuna, Eray Atil 111
- Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa**
 Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profilleri
 Tansu Bıçakcıoğlu, Şimal Yörük, Hamit Kaan Müştak 118
- Investigation of zoonotic helminths in children’s playgrounds in Sivas province**
 Sivas ilinde çocuk oyun parklarında zoonotik helmintlerin araştırılması
 Ufuk Erol, Kürşat Altay, Ömer Faruk Şahin, Osman Furkan Urhan 124
- Temporal and spatial distribution of bovine tuberculosis outbreaks in Turkey (2005-2020)**
 Türkiye’de sığır tüberkülozu mihraklarının zamansal ve mekânsal dağılımı (2005-2020)
 Şahin Çakır, Mustafa Yakar, Fevziye İpek Keskin 130
- The effect of physically effective neutral detergent fiber on milk composition and milk yield**
 Fiziksel etkin nötral deterjan lif’in süt bileşimi ve süt verimi üzerine etkisi
 Hasan Atalay, Tanay Bilal, Bülent Ekiz 140
- Anadolu Merinoslarında İrisin hormon yanıtı üzerine bazı fizyolojik parametrelerin etkisi**
 Effect of some physiological parameters on the hormone response of Irisin in Anatolian Merino Sheep
 Bülent Bayraktar, Emre Tekce 145

Farklı Salmonella Typhimurium kökenlerinin taşıdıkları patojenite adası ve direnç genlerinin İn Silico analizi

In Silico analysis of pathogenicity island And resistance genes carried by different Salmonella Typhimurium strains

Özge Ünlü, Mehmet Demirci, Akın Yığın, Seda Ekici..... 151

Hidrojen peroksit dekontaminasyon etkinliğinin belirlenmesine yönelik mikrofluidik katalaz biyosensörü: Mikrobiyal optimizasyon

Microfluidic catalase biosensor designed for efficacy of hydrogenperoxide decontamination: Microbial optimization

Ahmet Keskin, Ahmet Koluman 157

Sağlıklı ve ishelli köpeklerde Genogrup I Picobirnavirusların tespiti ve moleküler karakterizasyonu

Detection and molecular characterization of Genogroup I Picobirnaviruses in dogs

İlke Karayel Hacıoğlu 164

Türkiye’de sığır tüberkülozu enfeksiyonun epidemiyolojik sorunları ve çözüm analizi

Epidemiological problems and solution analysis of bovine tuberculosis infection in Turkey

Şahin Çakır, Kadir Serdar Diker 169

Derleme / Review Article**Tarihsel bir biyolojik ajan ve KBRN açısından önemi: Ruam, Mankafa "Burkholderia mallei"**

A historical biological agent and its importance for CBRN: Glanders "Burkholderia mallei"

Ahu Pakdemirli, Dilek Dülger..... 178

Viral enfeksiyonlar ile mücadelede en hızlı silahlardan biri: antiserum/plazma tedavisi

One of the fastest weapons in fighting viral infections: antiserum/plasma therapy

Bahattin Taylan Koç, Kadir Serdar Diker 185



The assessment of the protein profiles and oxidant/antioxidant status in conjunctival *Brucella melitensis* Rev.1 vaccinated sheep

Gülay Çiftci¹ , Alper Çiftci^{2*} 

^a Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Atakum, Samsun, Turkey.

^b Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Atakum, Samsun, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 07.05.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 08.07.2021

Abstract: Brucellosis is a zoonotic and economically significant animal disease worldwide. The most frequently used vaccine to avoid brucellosis in small ruminants is the Rev.1 conjunctival *Brucella melitensis* vaccine. The aim of this study was to investigate the effects of *B.melitensis* Rev.1 conjunctival vaccine on total protein, albumin, globulin levels, protein profiles and oxidant/antioxidant status in sheep. Ten sheep were used as animal material for this purpose. The bloods taken before vaccination were used as negative control. The sera obtained one month after administration of single dose *B.melitensis* vaccine were used as experimental materials. The spectrophotometric method estimated total protein, albumin, globulin levels, total antioxidant capacity (TAS), and total oxidant capacity (TOS). Protein profile was determined by sodium-dodecyl-sulphate and native-polyacrylamide gel electrophoresis methods. It was determined that total protein and globulin levels increased slightly in sero positive sheep ($P>0.05$). There was no difference for protein profiles in both electrophoresis methods. The band densities of albumin decreased but gamma globulin increased slightly after vaccination. TAS levels decreased significantly ($P<0.05$), but TOS levels increased slightly ($P>0.05$). In conclusion, Rev.1 conjunctival *Brucella* vaccine was thought to be safe to use to prevent Brucellosis, and the addition of antioxidant after vaccination can reduce oxidative stress.

Keywords: *Brucella melitensis* Rev.1, Conjunctival vaccine, Oxidative stress, Protein profile.

Konjunktival *Brucella melitensis* Rev.1 ile aşılanmış koyunlarda protein profillerinin ve oksidan/antioksidan durumunun değerlendirilmesi

Özet: Bruselloz, dünya çapında zoonotik ve ekonomik açıdan önemli bir hayvan hastalığıdır. Küçükbaş hayvanlarda brusellozdan korunmak için en sık kullanılan aşı Rev.1 konjunktival *Brucella melitensis* aşısıdır. Bu çalışmanın amacı, koyunlarda *B. melitensis* Rev.1 konjunktival aşısının total protein, albümin, globulin düzeyleri, protein profilleri ve oksidan/antioksidan durumuna etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla hayvan materyali olarak on koyun kullanıldı. Aşılama öncesi alınan kanlar negatif kontrol olarak kullanıldı. Tek doz *B. melitensis* aşısının uygulanmasından bir ay sonra elde edilen serumlar deney materyali olarak kullanıldı. Total protein, albümin, globulin seviyeleri ile antioksidan kapasite (TAS) ve oksidan kapasiteyi (TOS) spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Protein profili, sodyum-dodesil-sülfat ve natif-poliakrilamid jel elektroforez yöntemleri ile belirlendi. Sero-pozitif koyunlarda total protein ve globulin düzeylerinin hafif yükseldiği belirlendi ($P> 0,05$). Her iki elektroforez yönteminde de protein profilleri açısından fark bulunmadı. Aşılamadan sonra albüminin bant yoğunluklarının azaldığı, ancak gama-globülin yoğunluklarının hafifçe artmış olduğu tespit edildi. TAS düzeyleri önemli ölçüde azalmışken ($P <0,05$), TOS düzeylerinde biraz artış gözlemlendi ($P> 0,05$). Sonuç olarak, Rev.1 konjunktival *Brucella* aşısının Brusellozdan korunmak için kullanımının güvenli olduğu ve aşılamadan sonra rasyona antioksidan eklenmesinin oksidatif stresi azaltabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: *Brucella melitensis* Rev.1, Konjunktival aşı, Oksidatif stres, Protein profili.

Introduction

Brucellosis is a significant contagious bacterial infection in animals worldwide, and a potential zoonotic disease. In general, the disease can cause significant productivity loss through abortion, stillbirth, low herd fertility and low milk production (Diaz Aparicio 2013). Control and eradication programs are implemented in many countries where brucellosis is observed. Many countries where brucellosis is detected adopt control and eradication

programs (Revappayya et al. 2017). In this way it seeks to reduce animal infection and mitigate the impact of the disease on human health as well as on animal health and development, and the other step involves steps to avoid the reappearance of the disease (Kaplan 1966; Alton and Elberg 1967; WHO 1986; Blasco 1997). The most widely used vaccine for the prevention of brucellosis in sheep and goats is the *B. melitensis* Rev.1 vaccine (Marzetti et al. 2013; Shome et al. 2014).

Yazışma adresi / Correspondence: Alper Çiftci, University of Ondokuz Mayıs, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Atakum, Samsun, Turkey, e-mail: aciftci@omu.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-5384-2381 • ²0000-0001-8370-8677

There is a balance between the development of free radicals and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanisms in the animal body (Hornback and Roop 2006). Due to normal aerobic metabolism, reactive oxygen species (ROS) can be produced in all living organisms, and their levels increase during infection. One of the essential molecules that destroy bacteria in phagocytic cells such as macrophages and polymorphonic neutrophils (PMNs) is the reactive oxygen species (Dieffenbach and Tramont 2005). They settle in phagocytic cells and release phagosomes upon the growth of bacteria (Rada et al. 2008). They cause cell damage by peroxidation in DNA, protein and fatty acids (Orem et al. 1997; Halliwell and Gutteridge 1999). Reactive oxygen species, such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical are released by neutrophils and have been shown to play an important role in inflammation, and cell injury (Vladimirov 2004). *Brucella* infection induced oxidative stress and lipid peroxidation in human, cattle and rats (Erdogan et al. 2007; Nisbet et al. 2007). Cytotoxic effects of oxidants include protein oxidation, lipid peroxidation, DNA damage and the inhibition of cellular metabolic pathways (Kim et al. 2006). Cells and tissues have antioxidant systems that inhibit radical products and reactions. Studies have demonstrated altered total oxidant (TOC) and total antioxidant capacity (TAC), or oxidative stress index (OSI) in case of local and systemic inflammation or infection (Usta et al. 2012; Celi and Gabai 2015; Oral et al. 2015).

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is a versatile and powerful technique widely used for protein separation based on their molecular weights (Laemmli 1970). In this study protein fractions were evaluated by SDS-PAGE and Native-PAGE due to its importance in the resolution of serum proteins. Determination of albumin and/or globulin concentrations by serum protein electrophoresis in domestic animals is an important diagnostic method. Determination of the total oxidant and antioxidant level and protein profile helps in the evaluation and diagnosis of the disease process along with other clinical and laboratory studies. For this purpose, it was aimed to determine the effects of Rev.1 conjunctival *Brucella* vaccine on sheep protein profile, total oxidant/antioxidant levels and oxidative stress index.

Materials and Methods

Experimental animals

Ten 5-months-old female Karayaka sheep, known to be unvaccinated, were used in the study. The group from which blood was collected from Vena jugularis before vaccination formed the control group. The experimental group consisted of animals from which blood was collected one month after vaccination. The vaccine, which was supplied lyophilized, was homogenized by melting it with a dilution liquid colored with Patent Blue V. 5-month-old female Karayaka sheep was applied as $40 \pm 2 \mu\text{l}$ (1 drop) by installing a dropper in the bottle containing the reconstituted vaccine. The vaccine was administered in a single dose. After vaccination, blood was collected from Vena Jugularis (Çiftci et al. 2019).

Blood samples taken into anti-coagulated tubes were centrifuged at 1550 g and 4°C for 10 minutes to collect the serums to be used in the experiments. The clear blood serum on top was taken into plastic vials and kept at -80°C until analysis was performed.

Serological analysis

Rose Bengal (RB) Plate Test for the presence of specific antibodies and Standard Tube Agglutination (STAT) test for the determination of specific antibody titers were applied to the sera obtained from blood taken before and after vaccination (Çiftci et al. 2019).

Biochemical analysis

Total protein, globulin and albumin levels in sheep were measured by serum biochemistry autoanalysers (Autolab, AMS srl, Aotu analyzer, Netherlands) using commercial autoanalyzer test kits (Audit Diagnostics, Ireland).

Serum total antioxidant, total oxidant level measurement and Oxidative Stress Index

Total antioxidant status (TAS) was measured using commercial kits (Rel Assay Kit Diagnostics, Turkey) (Erel 2005). Results are expressed as mmol Trolox equiv/lt.

Total oxidant status (TOS) was measured using commercial kits (Rel Assay Kit Diagnostics, Turkey) (Erel 2004). Results are presented as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/lt.

The calculation of the OSI was expressed as the percentage of the ratio of TOS levels to TAS levels, the mmol value in the unit of the TAS test was converted to μmol as in the TOS test (Erel 2004). The results

are presented as "arbitrary unit" (AU) and calculated according to the formula $[OSI = (TOS; \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{equiv/l}) / (TAS, \text{mmol Trolox equiv/l}) \times 10]$

Serum protein profile

The serum protein profiles of the sera which were obtained before and one month after vaccination were determined by Native- and SDS-PAGE methods as described by Laemmli (1970). Protein concentration in the serum was measured by spectrophotometric method before electrophoresis with a nano-drop spectrophotometer.

Serum protein electrophoresis was used for the determination of albumin, alpha-1 globulin, alpha-2 globulin, beta globulin and gamma globulin (Parish and Marchalonis 1970). For this aim, twenty μl of sample was loaded on the separation gel (4%). Proteins were separated in 10% Native-PAGE gel with a 100 V for 90 min. The gel was stained with the Blue silver method (Candiano et al. 2004). The serum proteins were differentiated SDS-by PAGE (7.5 μl acrylamide + 10% SDS, 20 μl sample, 200 V and 150 mA, about 60 min) according to molecular weights (Laemmli 1970). After electrophoresis, the bands were stained with the Blue silver method. The molecular weights of the protein profile were calculated using the Kodak Molecular Image Analysis Software program.

Statistical analysis

SPSS statistical software v.21 (IBM Corp., Armonk, NY) was used for statistical analysis. Paired samples T test was used to determine the variations among the parameters examined in the groups.

Results

Serological analysis results

All sera from blood taken before the vaccination gave negative RBPT results, while all sera from the experimental groups (n=10) gave positive reactions.

Serum antibody titers were determined as a result of STAT performed on 10 sera with positive reaction after RBPT. The titers were varied between 1/20-1/80. The mean titer of STAT results was calculated as 1/36. According to the STAT results, the antibody titer increased significantly ($p < 0.001$) at 1 month after vaccination compared to the pre-vaccination sera.

Biochemical parameter results

The concentrations of total protein, albumin and globulin in sheep before and after vaccination were 6.79 ± 0.18 and 7.13 ± 0.23 , 3.65 ± 0.08 and 3.51 ± 0.008 , 3.19 ± 0.18 and 3.63 ± 0.2 , respectively (Figure 1). It was determined that the amount of total protein and globulin increased slightly and the amount of albumin decreased slightly after vaccination compared to pre-vaccination ($P > 0.05$).

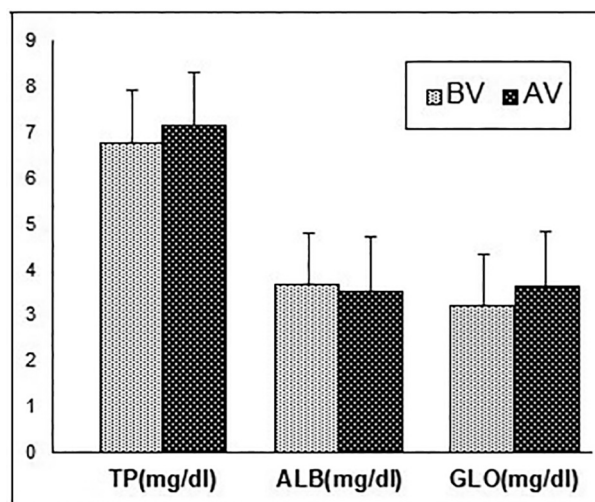


Figure 1. The mean \pm standard deviation (SD) levels of measured total protein (TP), albumine (ALB), globulin in sera obtained from before (BV) and after vaccination (AV).

Protein profile was investigated by SDS- and Native-PAGE methods. It was determined that there was no difference in protein profiles before and after vaccination by SDS- PAGE (Figure 2). In Native – PAGE method, albumin, alpha-1 globulin, alpha-2 globulin, beta globulin and gamma globulin profiles were investigated. After vaccination, it was determined that the albumin band density decreased slightly and the gamma globulin band density increased slightly compared to the prior vaccination (Figure 3).

Serum total antioxidant, total oxidant level measurement and oxidative stress index

The mean and standard error values of total antioxidant, total oxidant and oxidative stress index values in sheep pre- and postvaccinations are presented in the table (Table 1). It was determined that TAS level decreased after conjunctival vaccination in sheep, which was statistically significant ($P < 0.05$), and total oxidant and oxidative stress index increased slightly ($P > 0.05$) (Figure 4).

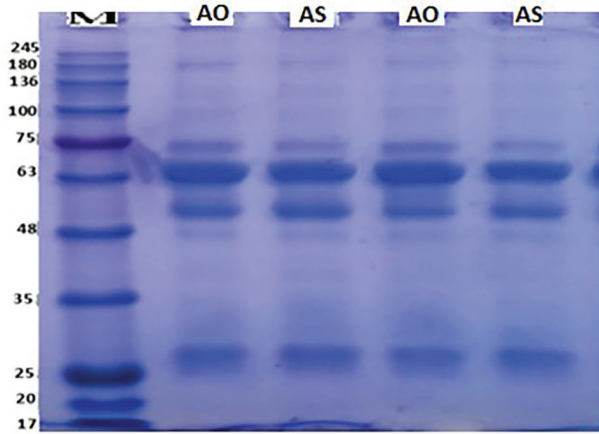


Figure 2. The protein profiles of serum taken before (BV) and after vaccination (AV) by SDS-PAGE.

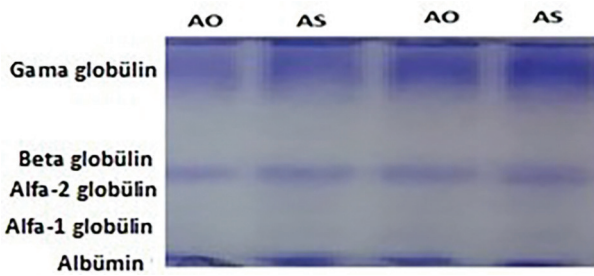


Figure 3. The protein profiles of serum taken before (BV) and after vaccination (AV) by Native-PAGE.

Table 1. The average levels of TAS, TOS and OSI in pre- (BV) and postvaccinated (AV) sheep.

	TAS (mmol/L)	TOS (micromol/L)	OSI (AU)
BV	2.13±0.18	22.99±2.14	0.1±0.009
AV	1.39±0.11	27.65±2.91	0.2±0.021
P	0.001	0.516	0.104

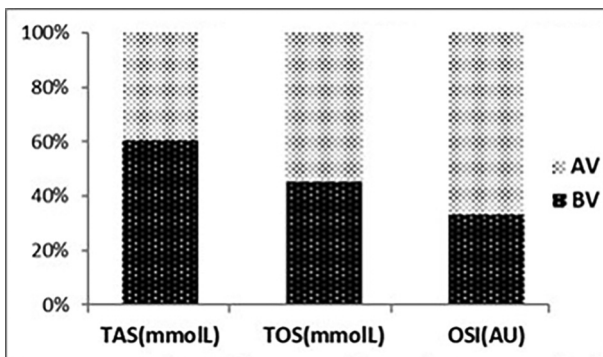


Figure 4. The percentages of TAS, TOS and OSI in pre- (BV) and post vaccinated (AV) sheep

Discussion and Conclusion

Brucellosis is a serious infectious disease that causes direct and indirect economic losses for animal owners around the world, such as reduction of milk and meat production through abortions/culling of positive reactors, disease control / eradication expenses and compensation for farmers. While eradication of brucellosis has been an important economic value, it is important for treatment purposes to determine its biochemical and cellular changes (Polycarp et al. 2017).

The microorganisms have different enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in place to protect against the harmful effects of reactive oxygen species. Antioxidant mechanisms are compromised under certain conditions and/or increases in ROS, and antioxidant mechanisms may be inadequate to avoid oxidative damage altogether and as a result, oxidative stress may evolve (Aruoma 1996; Halliwell and Gutteridge 1999). Specific plasma antioxidants influence the oxidant state and, in conjunction with antioxidants, shield it from the harmful effects of free radicals (Wayner et al. 1987). In our study, TAS ability in sheep with Rev.1 conjunctival vaccine was found to decrease significantly compared to pre-vaccination, and this was statistically significant ($P < 0.05$), whereas total oxidant and oxidative stress index increased marginally and this was not statistically significant ($P > 0.05$). Serefhanoglu et al. (2009) reported that TAC levels in people infected with *Brucella* decreased dramatically, while malondialdehyde, total peroxide and oxidative stress index parameters increased (Serefhanoglu et al. 2009; Al-Khafaji and Al-Farwachi 2012). TAC values were found to be statistically significantly lower and TOC and OSI values were found to be significantly higher, compared to the control group reported in cattle with brucellosis (Karaagac et al. 2011; Merhan et al. 2017). *Brucella abortus*-infected cattle reported exposure of *Brucella*-infected bugs to oxidative stress (Kataria et al. 2012; Perin et al. 2017).

Blood serum or plasma is a blood fluid which sometimes changes as an active component invades the blood. Albumin and immunoglobulins are approximately 99 percent of the plasma proteins. The quantity of low serum or plasma proteins varies from pg/mL to ng/mL (Anderson and Anderson 2002). The level of serum protein is a critical component of animal laboratory diagnostic assessments. The increase in the total amount of protein may be due to the increase in the amount of

albumin or globulin, or may be increased because both are increased together. Hamada et al. (2013) reported that between healthy sheep and *Brucella*-infected sheep, there was no statistically significant difference between total protein and albumin levels. El-Boshy et al. (2009) reported a significant decrease in the serum albumin content of healthy camels compared to camels infected with *Brucella*. It was determined that the amount of total protein and globulin increased slightly and that the amount of albumin in sheep with the conjunctival brucellosis vaccine Rev.1 decreased slightly compared to before vaccination ($P>0.05$). A small rise in the total protein level was thought to be due to an improvement in the level of gamma globulin.

The protein profile was evaluated using the SDS-PAGE and Native-PAGE methods. It was determined that there was no band difference in the SDS-PAGE method in serums of pre- and postvaccinated animals. The band density found as increased slightly after vaccination. Albumin, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ and γ globulins were determined by the Native-PAGE method. Following vaccination, the band intensity of the γ globulin band increased significantly compared with before vaccination. Albumin, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ and $\beta 2$ globulins were observed not to have changed significantly. Gamma globulin band density has been reported to have increased significantly in cows infected with *Brucella*, sheep, camel and cows (El-Boshy et al. 2009; Hamada et al. 2013; Nath et al. 2014; Eilazab 2015). It has been stated that, in response to chronic antigenic stimulation, the increase in globulin fraction in chronic or subacute bacterial infections may result from the development of various immunoglobulins by plasma cells (Morag 2002).

Conjunctival Rev.1 vaccine in seropositive sheep compared to non-vaccinated has been thought to be significantly affected and a decrease of overall antioxidant levels. In conclusion, Rev.1 conjunctival *Brucella* vaccine can be used for protection against *Brucella* in a safe manner.

Ethical statement: This work was carried out in accordance with the Ethics Committee Decision of the Ondokuz Mayıs University Local Ethics Committee Decision (2013/44).

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Al-Khafaji WS, Al-Farwachi MI. (2012). Antioxidant status in pregnant ewes vaccinated with Rev.1 against brucellosis. *Iraqi J Vet Sci.* 26(1), 15-19.
- Alton GG, Elberg SS. (1967). Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine, a review of the 10 years of study. *Vet Bull.* 37, 793-800.
- Anderson NL, Anderson NG. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Prot.* 1(11), 845-867.
- Aruoma OI. (1996). Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad Biol Med.* 20, 675-705.
- Blasco JM. (1997). A review of the use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med.* 31, 275-283.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 25(9), 1327-1333.
- Celi P, Gabai G. (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Front Vet Sci.* 2, 1-13.
- Çiftci G, Yiğit Ö, Çiftci A. (2019). The effects of the conjunctival *Brucella* vaccine on some biochemical parameters in sheep. *Trop Anim Health Prod.* 51, 355-361.
- Diaz Aparicio E. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev Sci Technol.* 32(1), 53-60.
- Dieffenbach CW, Trammont EC. (2005). Innate (general or nonspecific) host defense mechanisms. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia; pp.34-42.
- Eilazab MFA. (2015). Evaluation of serum enzyme activities and protein fractions in *Brucella*-infected cows. *Turk J Vet Anim Sci.* 39, 480-484.
- El-Boshy M, Abbas M, El-Khodery H, Osman S. (2009). Cytokine response and clinicopathological findings in *Brucella* infected camels (*Camelus dromedarius*). *Vet Med.* 54, 25-32.
- Erdogan S, Aslantas O, Celik S, Atik E. (2007). The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Res Vet Sci.* 82, 181-186.
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 37(4), 277-285.
- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 38(12), 1103-1111.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., London: Oxford Science Publications.
- Hamada DM, Mohamed AH, Mabrouk A, Emad M, Ah ME. (2013). Seroprevalence of abortion causing agents in Egyptian sheep and goat breeds and their effects on the animal's performance. *J Agricult Sci.* 5, 92-101.
- Hornback ML, Roop RM. (2006). The *Brucella abortus* xthA-1 gene product participates in base excision repair and resistance to oxidative killing but is not required for wild-type virulence in the mouse model. *J Bacteriol.* 188, 1295-1300.
- Kaplan M. (1966). The problems of choice between control and eradication. Joint WHO/FAO Expert Committee Zoonoses, Geneva, Dec.6-12.

- Karaagac L, Koruk ST, Koruk I, Aksoy N. (2011). Decreasing oxidative stress in response to treatment in patients with brucellosis: could it be used to monitor treatment? *Int J Infect Dis.* 15, e346-e349.
- Kataria N, Kataria AK, Joshi A, Pandey N, Khan S. (2012). Serum Antioxidant Status to Assess Oxidative Stress in *Brucella* Infected Buffaloes. *J Stress Physiol Biochem.* 8, 5-9.
- Kim JA, Sha Z, Mayfield JE. (2006). Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect Immun.* 68, 3861-3866.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE. (2013). Recent trends in human *Brucella canis* infection. *Compar Immunol Microbiol Infect Dis.* 36, 55-61.
- Merhan O, Bozukluhan K, Kuru M, Büyük F, Özden Ö, Kükürt A. (2017). Investigation of Oxidative Stress Index and Lipid Profile in Cattle with Brucellosis. *J Kafkas Univ Vet Fac.* 23(6), 933-937.
- Morag GK. (2002). Veterinary Laboratory Medicine, Clinical Biochemistry and Haematology. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Nath R, Das S, Sarma S, Devi M. (2014). Comparison of blood profiles between healthy and *Brucella* affected cattle. *Vet World.* 7(9), 668-670.
- Nisbet C, Yarim GF, Ciftci A, Cenesiz S, Ciftci G. (2007). Investigation of serum nitric oxide and malondialdehyde levels in cattle infected with *Brucella abortus*. *Vet J Ankara Univ.* 54(3), 159-163.
- Oral H, Ogun M, Kuru M, Kaya S. (2015). Evaluation of certain oxidative stress parameters in heifers that were administered short term PRID. *J Kafkas Univ Vet Fac.* 21, 569-573.
- Orem A, Efe H, Deger O, Cimsit G, Uydu HA, Vanizor B. (1997). Relationship between lipid peroxidation and disease activity in patients with Behcet's disease. *J Dermatol Sci.* 16, 11-16.
- Parish CR, Marchalonis JJ. (1970). A simple and rapid acrylamide gel method for estimating the molecular weights of proteins and protein subunits. *Anal Biochem.* 34(2), 436-450.
- Perin G, Fávero JF, Severo DRT, Silva AD, Machado G, Araújo HL, Lilenbaum W, Morsch VM, Schetinger MRC, Jordão RS, Stefani LM, Bottari NB, Da Silva AS. (2017). Occurrence of oxidative stress in dairy cows seropositives for *Brucella abortus*. *Microb Pathogen.* 29, 196-201.
- Polycarp TN, Yusoff SM, Benjamin EO, Salisi SM, Khairani S. (2017). Influence of dexamethasone-induced stress on oxidative stress biomarkers in non-pregnant does experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Compar Clin Pathol.* 26, 423-435.
- Rada B, Hably C, Meczner A. (2008). Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Sem Immunopathol.* 30, 237-253.
- Revappayya M, Basavaraj A, Shambulingappa BE, Surya Prasad V, Abhilash B, Srinivas K. (2017). Evaluation of safety and immunogenicity of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine administered through Conjunctival route in sheep and goats. *Int J Biol Sci.* 8(2), 103-107.
- Serephanoglu K, Taskin A, Turan H, Timurkaynak FE, Arslan H, Erel O. (2009). Evaluation of Oxidative Status in Patients with Brucellosis. *Braz J Infect Dis.* 13(4), 249-251.
- Shome R, Gupta VK, Rao KN, Shome BR, Nagalingam M, Rahman H. (2014). Detection of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccinal antibodies in sheep in India. *Adv Anim Vet Sci.* 2(35), 19-22.
- Usta M, Aras Z, Tas A. (2012). Oxidant and antioxidant parameters in patients with *Brucella canis*. *Clin Biochem.* 45, 366-367.
- Vladimirov YA. (2004). Reactive oxygen and nitrogen species diagnostic, preventive and therapy. *Biochem.* 69(1), 57.
- Wayner DD, Burton GW, Ingold KU. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta.* 924, 408-419.
- World Health Organisation. (1986). Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Sixth Report, Geneva, pp. 74-75.



Aflatoxin M₁ contamination of Anatolian Water Buffalo milk

Tahsin Onur Kevenk¹

¹Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Aksaray, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 03.08.2021, **Kabul Tarihi** / Accepted: 03.09.2021

Abstract: Aflatoxin M₁ (AFM₁), a hepatotoxic metabolite, occurs due to the consumption of feeds contaminated with aflatoxin B₁ (AFB₁) by lactating animals. This study aims to specify the presence and levels of AFM₁ in water buffalo milk produced widely in our region.

Between the years 2019 - 2021, a total of 250 raw water buffalo milk samples were used as material. All samples were transported to the laboratory in the cold chain (4°C) and analyzed. Tests were done with ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) technique and AFM₁ specific test kits Ridascreen® Aflatoxin M₁, r-biopharm were used for detection of AFM₁. First, the samples were prepared as described in the kit manufacturer's instructions. Later, for the calculation of AFM₁ levels, RIDASOFT WIN.NET software was also used as recommended.

Two hundred and fifty raw water buffalo milk samples were analyzed in duplicate, and the average values of the results was taken into account. While AFM₁ was not detected in 174 samples (69.6%), 76 sample (30.4%) was contaminated with AFM₁. However, it was observed that the AFM₁ levels of these 76 samples did not exceed the levels specified in the Turkish Food Codex.

In conclusion, although water buffalo milk and dairy products pose a potential risk in AFM₁, this risk was found relatively low in samples belong to our region. However, this situation may vary depending on the feeding conditions of lactating animals and sampling season. Therefore, it is recommended that similar and further studies are needed to diversify the data in the future.

Keywords: Aflatoxin M₁, ELISA, milk, public health, water buffalo

Anadolu Manda sütünde Aflatoxin M₁ kontaminasyonu

Özet: Hepatotoksik bir metabolit olan aflatoxin M₁ (AFM₁), süt hayvanları tarafından aflatoxin B₁ (AFB₁) ile kontamine olmuş yemlerin tüketilmesi nedeniyle oluşur. Bu çalışma, bölgemizde yaygın olarak üretilen manda sütünde AFM₁ varlığını ve düzeylerini belirlemeyi amaçlamaktadır.

Çalışmada, 2019 - 2021 yılları arasında toplam 250 adet çiğ manda sütü numunesi materyal olarak kullanılmıştır. Tüm numuneler soğuk zincirde (4°C) laboratuvara getirilmiş ve analiz edilmiştir. Testler ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tekniği ile yapılmış olup ve AFM₁'in tespiti için AFM₁'e özgü test kitleri Ridascreen® Aflatoxin M₁, r-biopharm kullanılmıştır. İlk olarak numuneler kit üreticisinin talimatlarında belirtildiği gibi hazırlandı. Daha sonra AFM₁ seviyelerinin hesaplanması için de önerilen RIDASOFT WIN.NET yazılımı kullanılmıştır.

İki yüz elli çiğ manda sütü örneği iki tekrar halinde analiz edilmiş ve sonuçların ortalama değerleri dikkate alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda, 174 örnekte (%69,6) AFM₁ saptanmazken, 76 örnekte (%30,4) AFM₁ tespit edilmiştir. Ancak bu 76 örneğin AFM₁ seviyelerinin Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen seviyeleri aşmadığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, manda sütü ve süt ürünleri AFM₁'de potansiyel risk oluştursa da bölgemize ait örneklerde bu risk nispeten düşük bulunmuştur. Ancak bu durum, emziren hayvanların beslenme koşullarına ve örnekleme mevsimine bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle gelecekte verilerin çeşitlendirilmesi için benzer ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Aflatoxin M₁, ELISA, halk sağlığı, manda, süt

Introduction

Aflatoxins are known as toxic and heterocyclic compounds synthesized by strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxins are divided into four groups, such as aflatoxin B₁, B₂, G₁,

and G₂. Aflatoxin M₁ (AFM₁) is the monohydroxylated hepatic metabolite of aflatoxin B₁ (AFB₁) that can be found in the milk and milk products of livestock due to feeding with AFB₁ contaminated feed (Nguyen et al. 2020). The International Agency Research on Cancer (IARC) has classified Aflatoxin M₁ in group

1 human carcinogen (Guo et al. 2019; Hussain et al. 2010; Kara and Ince 2014).

It has been reported that Aflatoxin M₁ is an exceptionally durable compound under milk processing conditions such as pasteurization or ultra-high temperature (De Roma et al., 2017; Oruc et al. 2006). Furthermore, milk and dairy products are essential food substances for humans because of containing valuable animal protein, vitamins, and essential fatty acids. At the same time, aflatoxin contamination is overly critical in terms of public health since milk and dairy products occupy an important role in infant nutrition (Galvano et al. 1998). Because children are more sensitive to aflatoxins than adults. It has been determined that the long-term effects of consumption of aflatoxin M₁ contaminated milk and dairy products may cause DNA damage, chromosomal abnormalities, and genotoxic effects (Galvano et al. 1996; Prandini et al. 2009).

As reported and standardized by the Turkish Food Codex, the maximum limit of contaminants for aflatoxins has to be less than 50 ng/l in milk and dairy products (TFC, 2011).

Anatolian Water Buffalo is a registered species originating from the Mediterranean Water Buffalo and adapted to the geography of Turkey, where it has been breeding for approximately 1500 years in Anatolia (Şahin, 2016).

According to the Turkish Statistical Institute (TSI), there are around 183500 water buffaloes in Turkey, and 20% of this population is in the Central Anatolian Region. Aksaray province is located in the Central Anatolia Region, where water buffalo breeding is quite common. Likewise, according to TSI data, in 2018, 66300 and 2019, 68000 tone water buffalo milk was produced in Turkey (TSI, 2020).

This study was planned due to the lack of up-to-date and detailed data about Anatolian water buffalo milk, widespread consumption of water buffalo milk and dairy products in our region, and the fact that aflatoxin contamination is a biological threat that should not be ignored in terms of public health.

Material and Methods

Sampling

A total of 250 raw water buffalo milk samples were collected from the breeders in Aksaray region of Turkey between September 2019 – June 2021.

The samples were procured from seven different breeders. All samples (approx. 50 mL) were taken into sterile centrifuge tubes and brought to the laboratory in an icebox at 2–4°C and stored at –20°C until analysis.

Methods

The ELISA screening method was applied for the analysis of water buffalo milk samples. For this purpose, AFM₁ specific test kits Ridascreen® Aflatoxin M₁ (r-biopharm R1121) were used (Biopharm, 2021).

Preparation of Samples

The raw water buffalo milk samples were prepared according to the kit manufacturer's instructions. First, samples were centrifuged at 3500 g for 10 min (Nüve, NF800R) to obtain skimmed milk. After defatted supernatant was isolated, 100 µl of it was used for analysis.

Test Procedure

According to the manufacturer's instructions, firstly, all reagents were brought to room temperature before usage. Furthermore, all samples in this study were analyzed twice to get more precise results. After inserting enough wells into the microwell holder, 100 µl antibodies were filled into wells. Then, plates were mixed gently and incubated at room temperature (20–25°C) for 15 minutes. After completion of incubation, the liquid in wells were poured out by micropipette, and wells were tapped forcefully on absorbent paper three times to ensure complete removal of liquid. Next, all wells were washed by Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich P4417). In the following step, 100 µl of standards or samples were added into wells, then plates were mixed gently and incubated at room temperature (20–25°C) for 30 minutes in the dark. Then, the washing procedure was repeated twice. Before the next washing procedure, 100 µl conjugate was pipetted into wells and mixed gently by shaking the plate manually. Then, they were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. Later, 100 µl of substrate/chromogen was added to each well, and the incubation step was repeated as written above. In the last phase, 100 µl of stop solution was added to each well, and the absorbance of samples was measured at 450 nm with an ELISA reader (ELX800, Bio-Tek Inst Inc USA). Specific software, the RIDASOFT® Win.NET, was used for the evaluation of data.

The detection limit of the Ridascreen® Aflatoxin M₁ kit was 5 ng/l, and the specificity was 100% to aflatoxin M₁.

Results

In this research, 250 raw water buffalo milk samples were investigated for Aflatoxin M₁ presence by ELISA technique, and all analyzes were repeated twice. Aflatoxin M₁ was detected in 76 (30.4%) samples; however, the result of 174 (69.9%) samples was found below the detection limit. Moreover, the

AFM₁ values of samples was detected between 5.12 – 36.7 ng/l. In Aflatoxin M₁ positive samples, the contamination levels 5-10, 11-20, 21-30, and 31-50 ng/l, 60.5% 25%, 7.9% and 6.6% was determined, respectively.

In this study, the resulting level of Aflatoxin M₁ in raw water buffalo milk samples did not exceed the levels specified in the Turkish Food Codex (50 ng/l).

The results are shown in Table 1.

Table 1. Occurrence of Aflatoxin M1 in Raw Anatolian Water Buffalo Milk Samples

	Negative Samples <5 ng/l	Positive Samples			
		76/250 (30.4%)			
Raw Water Buffalo Milk Samples	174/250 (69.6%)	5-10 ng/l	11-20 ng/l	21-30 ng/l	31-50 ng/l
		46/76 (60.5%)	19/76 (25%)	6/76 (7.9%)	5/76 (6.6%)

Discussion and Conclusion

In related investigations, Kamkar et al. (2014) reported that 46 (79%) of their samples were contained Aflatoxin M₁. Moreover, %52 of positive water buffalo milk samples contained higher levels than the maximum limit of the European Union and Codex Alimentarius (50 ng/l). These results show that our region harbors relatively lower risk in terms of AFM₁ contamination. In another study, De Roma et al. (2017) determined that 28 (7,2%) of water buffalo milk samples were observed to contain AFM₁. The AFM₁ contamination level in water buffalo milk samples were found between 4-31 ng/l in the mentioned study, and similar to our outcomes, they do not exceed the levels specified in the Turkish Food Codex (50 ng/l) as well. In Pakistan, Hussain et al. (2010) reported that 34.5% of their water buffalo milk samples contained AFM₁. In line with our findings, it was detected that 84,2% of contaminated samples were below the EU action level of 50 ng/l for AFM₁. Guo et al. (2019) revealed that 62,5% (85) of their samples contained AFM₁ in South China. In addition, similar to our results, 90,5% of their samples contained less than 50 ng/l AFM₁. Rahimi et al., (2010) investigated 75 water buffalo milk samples in their study and in 66/75 samples AFM₁ was found below the Turkish Food Codex (50 ng/l) levels consistent with our results.

There is very limited research in Turkey about AFM₁ contamination in raw Anatolian water buffalo milk. Kara and Ince (2014) reported that the presence of AFM₁ in raw water buffalo milk samples

in Afyonkarahisar, Turkey was 27% (34/126), and paralel to our results, none of the AFM₁ levels were above the Turkish Food Codex.

It is known that several factors such as feed quality, environmental contamination, and seasonal factors affect the composition of milk. It has been reported that the risk of Aflatoxin M₁ arises as a result of feeding farm animals with aflatoxin B₁ contaminated feed or silage. These specific and local circumstances can be cited as the main reason for different contamination rates between the present study and others.

The results of this study indicated that the AFM₁ contamination in raw Anatolian water buffalo milk samples were not higher than the limit specified in the Turkish Food Codex. However, these results should be taken seriously in terms of public health because people from all age groups can consume milk and dairy products in different amounts. Furthermore, in the strategy of “from farm to fork” it is vital to struggle with AFB₁ contamination in animal feeds by improving process and storage conditions, so the AFM₁ risk does not exist in milk and dairy products. Finally, milk, dairy products, and animal feed should be monitored regularly to keep the AFM₁ hazard under control.

Ethical Statement: This study does not present any ethical concerns.

Conflict of Interest: The author has no conflicts of interest to declare.

Acknowledgment: A part of this research was presented as a summary at International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (16-18 December 2020).

References

- Biopharm, R. (2021). Enzyme immunoassay for the quantitative determination of aflatoxin M₁. GmbH, Germany. (Ridascreen® Aflatoxin M₁ R1121).
- De Roma, A., Rossini, C., Ritieni, A., Gallo, P., & Esposito, M. (2017). A survey on the Aflatoxin M₁ occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. *Food Control*, 81, 30-33. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.034
- Galvano, F., Galofaro, V., de Angelis, A., Galvano, M., Bognanno, M., & Galvano, G. (1998). Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. *J Food Prot*, 61(6), 738-741. doi:10.4315/0362-028x-61.6.738
- Galvano, F., Galofaro, V., & Galvano, G. (1996). Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. *Journal of Food Protection*, 59(10), 1079-1090. doi:10.4315/0362-028X-59.10.1079
- Guo, L., Wang, Y., Fei, P., Liu, J., & Ren, D. (2019). A survey on the aflatoxin M₁ occurrence in raw milk and dairy products from water buffalo in South China. *Food Control*, 105, 159-163. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.033
- Hussain, I., Anwar, J., Asi, M. R., Munawar, M. A., & Kashif, M. (2010). Aflatoxin M₁ contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*, 21(2), 122-124. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.004
- Kamkar, A., Yazdankhah, S., Mohammadi Nafchi, A., & Mozaffari Nejad, A. S. (2014). Aflatoxin M₁ in raw cow and buffalo milk in Shush city of Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(1), 21-24. doi:10.1080/19393210.2013.830277
- Kara, R., & Ince, S. (2014). Aflatoxin M₁ in buffalo and cow milk in Afyonkarahisar, Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(1), 7-10. doi:10.1080/19393210.2013.825646
- Nguyen, T., Flint, S., & Palmer, J. (2020). Control of aflatoxin M₁ in milk by novel methods: A review. *Food Chemistry*, 311, 125984. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125984
- Oruc, H. H., Cibik, R., Yilmaz, E., & Kalkanli, O. (2006). Distribution and stability of Aflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Additives & Contaminants*, 23(2), 190-195. doi:10.1080/02652030500389048
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984-991. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005
- Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., & Kazemini, H. R. (2010). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 129-131. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.028



Genetic analysis of Canine adenovirus type 2 strains circulating in Turkey from past to present

Fahriye Sarac^{1*}, Veli Gulyaz², Mustafa Hasoksuz³, Serdar Uzar⁴, İrem Gulacti⁵, Esra Satir⁶, Pelin Tuncer-Göktuna⁷, Eray Atıl⁸

^{1,4,5,6,7,8} Pendik Veterinary Control Institute, Pendik, Istanbul, Turkey.

² Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Şanlıurfa, Turkey.

³ Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Hadimköy, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 05.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 02.12.2021

Abstract: Canine Adenovirus Type-1 (CAV-1) and Canine Adenovirus Type-2 (CAV-2) are causes of infectious canine hepatitis and infectious canine laryngotracheitis in both domestic and wild life, respectively. The epidemiology of the virus is not clear enough in the most territory. For this purpose, strains circulating in Turkey over a ten-year period were examined at the molecular level and a genetic heterogeneity was observed. In order to carry out this study, 32 fecal samples collected from shelter dogs with diarrhea in 2011 were used. Firstly, virus isolation was performed in MDCK cell line and cytopathogenic effects were observed in 4/32 samples. Secondly, four CPE-positive isolates were found positive for the E3 gene of CAV-2 by PCR. Strains obtained as a result of sequencing were placed on a different branch from other Turkish isolates under the same subgroup in the phylogenetic tree. According to partial E3 gene analysis, seven amino acid substitutions were detected between the strains. Due to Shannon entropy value and ConSurf analysis, it was determined that all amino acid changes occurred in important antigenic regions. This study pointed out the possible genetic heterogeneity among Turkish CAV-2 strains.

Keywords: Canine adenovirus type 2, molecular characterization, virus isolation

Geçmişten günümüze Türkiye’de sirküle olan Canine adenovirus tip 2 suşlarının genetik incelemesi

Özet: Canine Adenovirus Tip-1 (CAV-1) ve Canine Adenovirus Tip-2 (CAV-2) hem evcil hem de vahşi yaşamda sırasıyla enfeksiyöz köpek hepatiti ve enfeksiyöz köpek laringotrakeitinin nedenleridir. Virus epidemiyolojisi çoğu bölgede yeterince net değildir. Bu amaçla Türkiye’de on yıllık bir süre zarfında sirküle olan suşlar moleküler düzeyde incelendi ve genetik bir heterojenlik gözlemlendi. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için 2011 yılında ishalleri barınak köpeklerinden toplanan 32 dışkı örneği kullanıldı. İlk olarak, MDCK hücre hattında virus izolasyonu yapıldı ve 4/32 örnekte sitopatojenik etkiler (CPE) gözlemlendi. İkinci olarak, CPE pozitif dört izolat CAV-2’nin E3 geni yönünden PCR ile pozitif bulundu. Sekans işlemi sonucu elde edilen diziler filogenetik ağaçta aynı alt grup altındaki diğer Türk izolatlarından farklı bir dal üzerine yerleşti. Kısmi E3 gen analizine göre, suşlar arasında yedi amino asitte değişim tespit edildi. Shannon entropi değeri ve ConSurf analizine göre tüm amino asit değişikliklerinin önemli antijenik bölgelerde meydana geldiği belirlendi. Bu çalışma, Türkiye CAV-2 suşları arasındaki olası genetik heterojeniteye dikkat çekmektedir.

Anahtar kelimeler: Canine adenovirus tip 2, moleküler karakterizasyon, virus izolasyonu

Introduction

Adenoviruses are enveloped, fully hexo-square, with icosahedral symmetry and 70-90 nm in diameter. The viral genome is a double-stranded single linear DNA molecule size of 26-45 kbp, and the viral genome synthesizes about 40 proteins (Barthold et al. 2011). Mapping with restriction endonucleases and sequencing of genomic DNA has been useful for the precise categorization of viral strains. In

general, these results are consistent with the categorization results based on serological cross-reactions (Parthiban et al. 2009).

Canine adenovirus type-1 (CAV-1) causes infectious canine hepatitis (ICH) by replicating in the digestive tract and vascular endothelium. Clinical signs of CAV-1 infection include fever, apathy, anorexia, increased thirst, and abdominal pain on

Yazışma adresi / Correspondence: Fahriye Sarac, Pendik Veterinary Control Institute, Pendik, Istanbul, Turkey
E-mail: fahriye.sarac@yahoo.com

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

⁴0000-0002-0120-7148 • ⁵0000-0002-9240-201X • ⁶0000-0001-8607-3873 • ⁷0000-0002-7468-0155 • ⁸0000-0003-1923-1186

palpation behind the liver that appears swollen. Most CAV-1 infections in dogs are subclinical, in some cases, the virus causes systemic disease (Mohammadi et al. 2011). Canine adenovirus type-2 (CAV-2) mostly infects respiratory tissues and induces canine infectious laryngotracheitis in dogs, raccoons, foxes, wolves, and marine mammals (Hamir et al. 1992; Hu et al. 2001; Parthiban et al. 2009; Yang et al. 2020). It causes a localized respiratory disease in dogs and is one of the potential causes of the canine infectious respiratory disease complex (CIRDC) or kennel cough syndrome (an acute respiratory disease of canines). It is characterized by sudden onset, cough with variable expectoration, and nasovascular discharge (Chaturvedi et al. 2008; Day et al. 2020). These signs may vary according to the host immune status and virus strain. Puppies are the most susceptible group to this infection and present the highest fatality rate (Cunha et al. 2020). Even the main route of spread of CAV-2 is the respiratory tract, both viruses are also shed in the feces and urine of the infected or recovered dogs (Hu et al. 2001; Mohammadi et al. 2011), thus urine and feces are important sources of infection to healthy dogs (Chaturvedi et al. 2008). Although there are antigenic relationships and cross-protective immunity between these two viruses, restriction endonuclease analysis has shown that they are genetically different types. The nucleotide similarity between the two viruses has been reported to be 75% (Buonavoglia and Martella 2007). The killed or attenuated CAV-2 vaccine can be used to protect dogs from both infections and does not cause post-vaccinal corneal edema unlike the CAV-1 vaccine (Hu et al. 2001).

Vaccines have been widely used for many years. It has been stated that ICH has disappeared with herd immunity obtained in areas where vaccination has been done for years (Barthold et al. 2011). In Turkey, a programmed vaccination against adenoviral infections is not carried out only imported vaccines are applied upon request of animal owners in private clinics.

The presence of adenovirus infections has been demonstrated mostly by serological methods and some strains have been sequenced (Yıldırım et al. 2009; Gür and Acar 2009; Bulut et al. 2013; Can Şahna and Aslan 2015; Timurkan et al. 2018). However, detailed molecular studies have not been conducted in Turkey. For this purpose, to investigate the genetic diversity among canine adenovirus strains in Turkey, sequences obtained from the west

of the country were compared with other CAV-2 strains detected from eastern Turkey and the world.

Material and methods

Clinical samples

A total of 32 fecal samples collected from 0-6 months old unvaccinated dogs with diarrhea were sent to Pendik Veterinary Control Institute (PVCI) in 2011 for the diagnosis from three shelters in Istanbul province of western Turkey. Samples were dispersed and homogenized in 2 ml of sterile PBS treated with antibiotics (penicillin 5000 IU/ml, streptomycin 2500 µg/ml) and centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. Supernatants were filtered by 0.22 µl and kept at -80°C until use. As these samples were sent to the PVCI for diagnosis, no ethical approval was required.

Virus isolation and titer determination

For the virus isolation, blind passages were performed immediately after the samples reached the laboratory. The 100 µl supernatants of the samples were inoculated into Madin Darby canine kidney (MDCK) cell cultures (2×10^5 /ml cells in 25 cm² flasks) then incubated for 1 hour at 37°C for adsorption of the virus. The surface of the cells was washed with PBS and the cell cultures were incubated at 37°C by adding E-MEM (Multicell, Canada) containing 2% FCS (GE Healthcare, Sweden). At the end of the 7th day or when 80-90% cytopathic effect (CPE) was observed in cells (within 3-4 days), flasks were placed in the freezer at -20°C. Suspensions were freeze-thawed in a 37°C water bath and then centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes at 4°C and collected for the following passages and molecular analysis.

Serial dilutions were performed from 10^{-1} to 10^{-6} in 96 well plates to determine the TCID₅₀/ml titers of CAV strains isolated in MDCK cell cultures. From each dilution, 100 µl was placed in four wells, and 50 µl of the MDCK cell culture (3×10^5 /ml cells) was added to all dilutions. Wells were also prepared for cell control. The plate was incubated at 37°C with 5% CO₂ and checked every day. At the end of four days, the formation of CPE due to the growth of viruses was assessed. The TCID₅₀ was calculated by Spearman- Kärber method (Spearman 1908; Kärber 1931).

Molecular analysis

After the third blind passage, CPE positive cell culture supernatants were analyzed by PCR assay.

As a positive control, attenuated Vanguard Plus 5L4' CAV-2 vaccine strain (Pfizer Animal Health, Lincoln, Nebraska, ABD) and for DNA extraction DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Group, US) were used according to the protocols specified in the kit. To amplify of E3 gene, HA1; forward 5'-CGC GCT GAA CAT TAC TAC CTT GTC-3' and HA2; reverse 5'-CCT AGA GCA CTT CGT GTC CGC TT-3' primers were preferred in this study. HA1 is complementary to the genomic L chain at positions 770 to 791 in CAV-1 and 1387 to 1408 in CAV-2. HA2 is complementary to the genomic R chain at positions 1274 to 1253 in CAV-1 and 2413 to 2392 in CAV-2 (Yang et al. 2020). The PCR was optimized in 25 µl reaction volume. The reaction mixture consisted of 1×PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide, 15 pmol of each primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase (MBI, Fermentas), and 5 µl of template DNA (50 ng). PCR was conducted in a thermal cycler (Techné, UK) for 9 min at 95°C and 35 cycles at 94°C for 1 min, 59°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final amplification at 72°C for 10 min. PCR products (508 bp for CAV-1 and 1030 bp for CAV-2) were visualized under ultraviolet light after electrophoresis on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide.

Following the PCR, the products were purified using PCR Purification Kit (Min Elute®, QIAGEN, USA), and the purified PCR products were subjected to an automatic sequencer (ABI 3130 XL, USA) available in the Molecular Genetic Laboratory Department of PVCI. Four sequences have been loaded to the GenBank under accession numbers in 2021: MW811327- MW811330. Those and other reference DNA sequences obtained from the

NCBI GenBank were analyzed in the MEGA 7.0.26 software. The Clustal W alignment method was used to determine the differences in amino acids. For phylogenetic relationships, the neighbor-joining method was used with 1500 bootstrap replicates. Other sequences GenBank accession numbers used in the phylogenetic tree were: EF057101, GQ340423, GQ915311, GU226970, JN418926, JX416838, JX416841, JX416842, KF676978, KU315335, KU725674, KY775390, KY775391, KY775392, KY775393, M60937, MN652567, MT318141, MT892837, S38212, S38238, U77082, Y07760.

Predicting the antigenic significance of variable residues and estimating the epitopes in the E3 gene, Shannon entropy (Threshold was set as default: 1) (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>), and conservation surface mapping (ConSurf) were used, respectively (Shannon 1948; Ashkenazy et al. 2010, 2016; Celniker et al. 2013).

Results

Virus isolation and titers

After inoculation of specimens onto MDCK cells, rounding of cells, detachment from the surface, and the typical grape cluster-like CPE were observed in MDCK cells only in 4/32 samples after 2nd-3rd passage onwards (Figure 1). The titer of the strains in the MDCK cells at 96 hours post-infection was found to be as 10^{-6.0}, 10^{-6.0}, 10^{-6.5}, 10^{-6.75} TCID₅₀/ml, and isolates were named as CAV2/TUR/PenCAV-5/2011, CAV2/TUR/PenCAV-6/2011, CAV2/TUR/PenCAV-7/2011, and CAV2/TUR/PenCAV-9/2011, respectively.

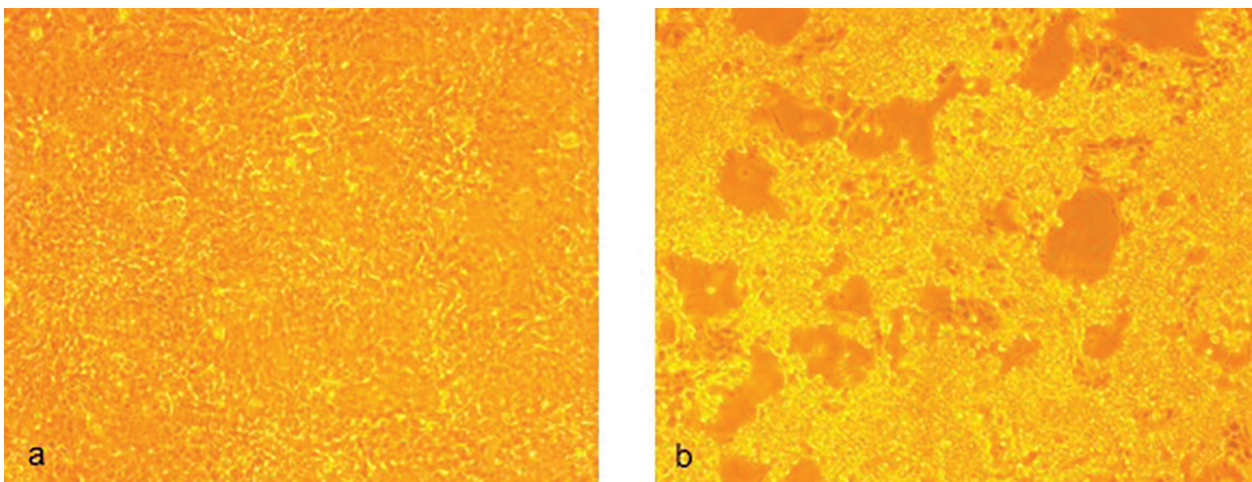


Figure 1. CPE view of CAV isolates in MDCK cell cultures*.

*a: negative control, b: vacuole and rounding of cells between cells

Molecular analysis

The supernatant of four isolates and positive control were found positive by PCR of the E3 gene with amplification of expected 1030 bp fragment in agarose gel electrophoresis that indicates isolates belong to CAV-2 (Figure 2).

Phylogenetic comparison of E3 gene nucleotides of canine adenovirus isolates and reference viruses from GeneBank are shown in Figure 3. According to the reference gene (Acces. No: GQ915311), the amino acid (aa) substitutions in our four isolates were detected at positions: 17 H-P, 126 A-T, 178 D-N, and 184 I-T. The aa substitutions between Turkey strains were shown in the grey boxes, while the aa differences between Turkey and America-Europe strains which also include one of the CAV-2 vaccine strains were displayed in empty boxes in Figure 4. Due to Shannon entropy value the residues 15, 17, 52, 63, 70, 93, 97, 109, 119, 126, 138, 142, 147, 152, 172, 178, 184, 186, 201, 216, 221, 222, 243, 250, 251, and 254 on E3 gene had a score bigger than 1. The lowest and the highest ConSurf

antigenicity scores of the 23 aa positions, excluding residues 93, 147, and 243, were detected at 4.579 and 7.515, respectively.

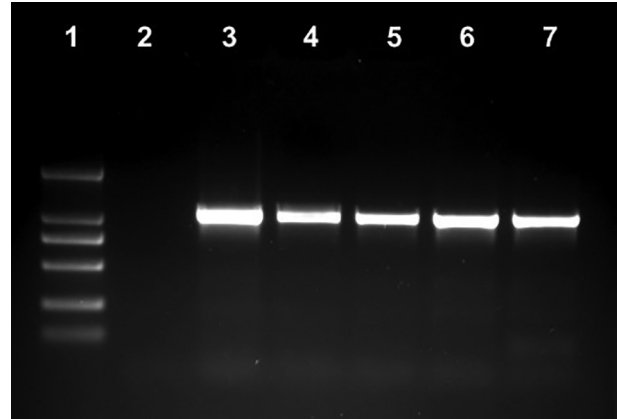


Figure 2. PCR product of amplified E3 gene of canine adenovirus*.

*1: DNA ladder (100-2000 bp, Qiagen, cat no. 239135), 2: Negative control, 3: Positive control, 4: CAV2/TUR/PenCAV-5/2011, 5: CAV2/TUR/PenCAV-6/2011, 6: CAV2/TUR/PenCAV-7/2011, 7: CAV2/TUR/PenCAV-9/2011

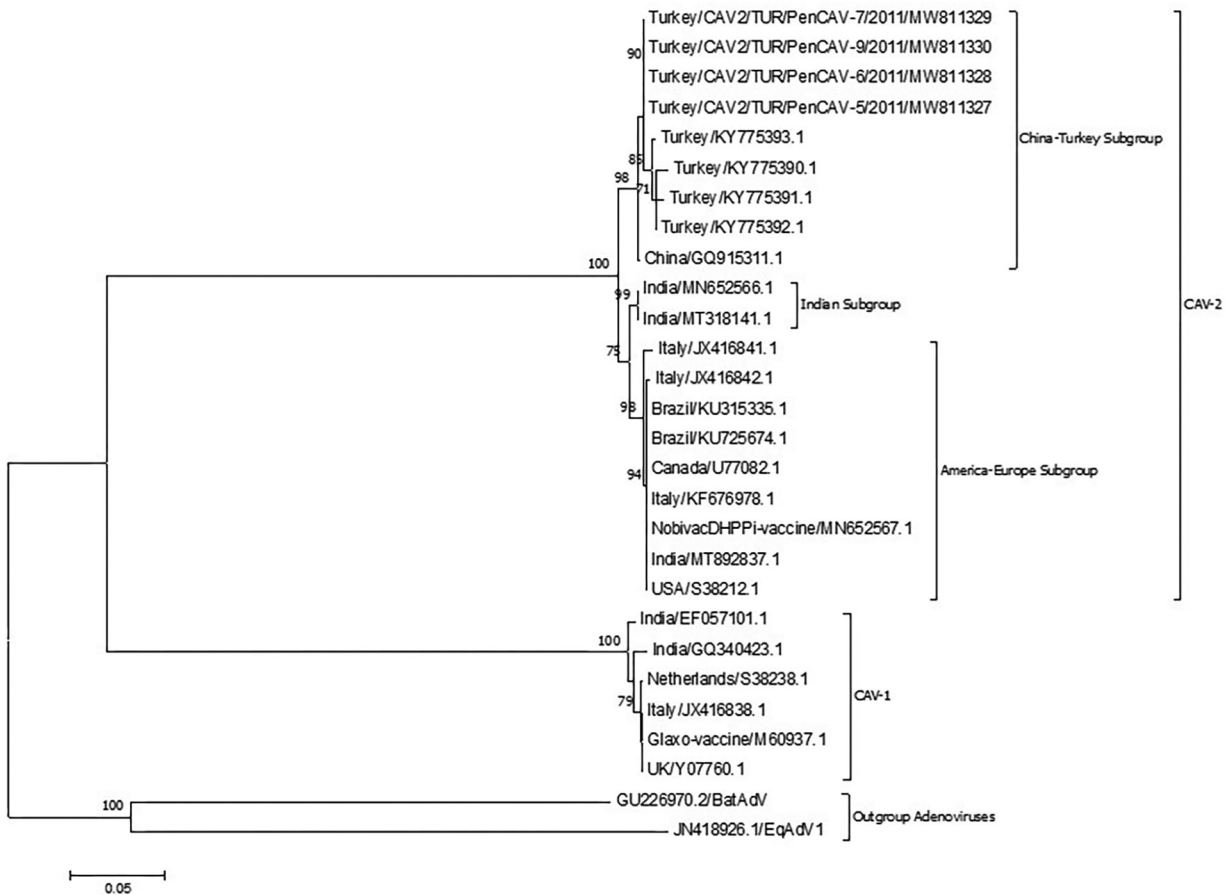


Figure 3. Phylogenetic tree of E3 gene of canine adenovirus isolates and reference viruses.

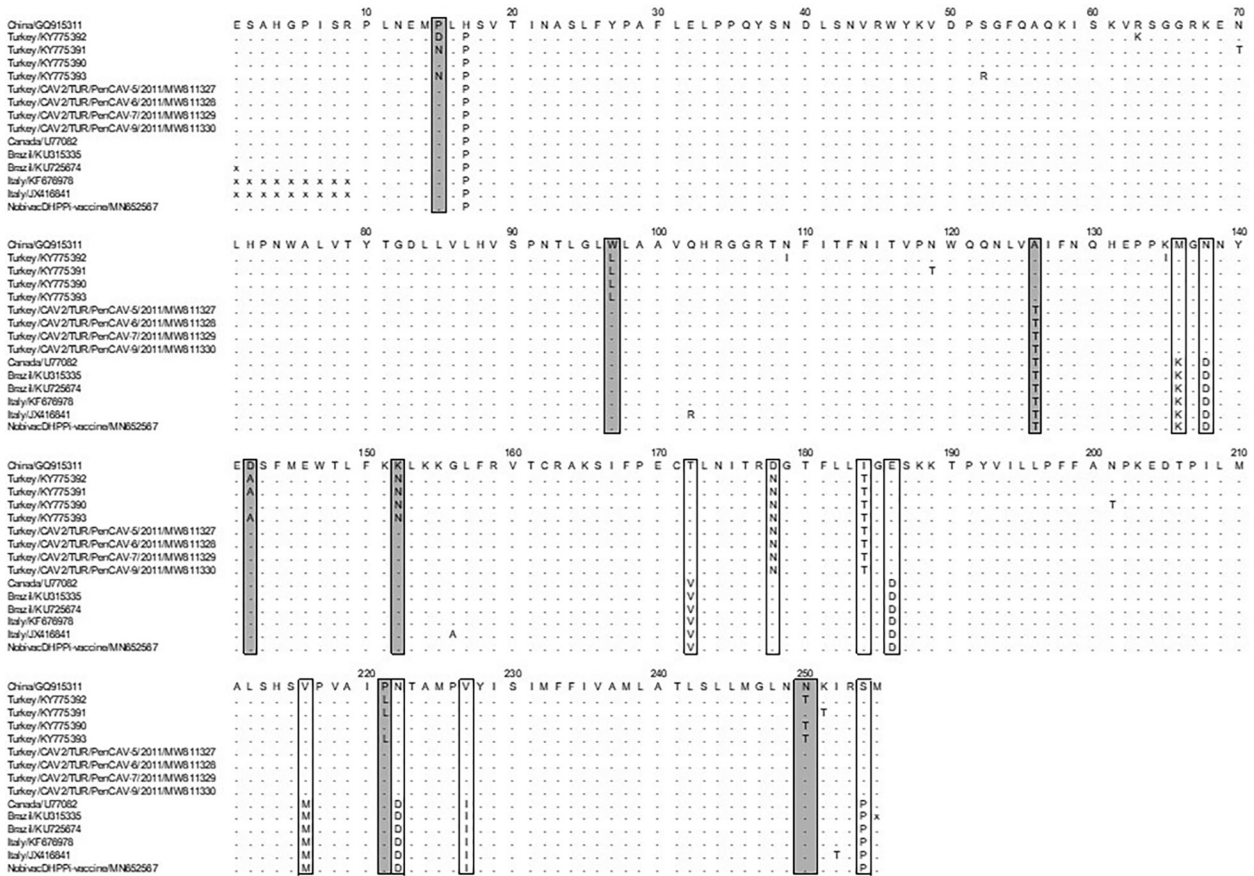


Figure 4. The amino acid comparison of CAV-2 strains among partial-length E3 gene (255 amino acids)*.

*The gray boxes indicate the aa substitutions between Turkey strains, while empty boxes indicate the aa substitutions between Turkey and America-Europe strains.

Discussion and Conclusion

ICH is caused by CAV-1 by replicating in the digestive tract and vascular endothelium, while CIRDC is a disease complex that occurs in dogs usually housed in groups, for example, in rehoming centers, boarding kennels, or veterinary hospitals. Both CAV-1 and -2 have been recovered from dogs suffering from CIRDC, but CAV-2 has been more commonly associated with the disease (Erles et al. 2004). There have been indications that CAV-2 may also be an enteric pathogen (Hamelin et al. 1985; Macartney et al. 1988; Hu et al. 2001). Moreover, it was presented that it can cross the blood-brain barrier (Benetka et al. 2006).

Antigenically related but genetically different two canine adenoviruses are important infectious viruses not only in domestic dogs but also in foxes in wildlife. However, the molecular epidemiology of the virus is not clear enough. The nucleic acid was detected in 58.8% of 51 dogs in Italy (Balboni et al. 2014). In Mexico, the antigen was shown

immunohistochemically with a rate of 57% (Damián et al. 2005). The seropositivity rates were 2.9% and 19.9% in Japan and Korea, respectively (Kim et al. 2006; Mochizuki et al. 2008). In Turkey, the seropositivity rate was reported between 36.3% and 100% (Gür and Acar 2009; Yıldırım et al. 2009; Bulut et al. 2013; Can Şahna and Aslan 2015) and antigen detection rate was 2.5% and 8.3% in clinically ill and healthy dogs, respectively (Can Şahna and Aslan 2015; Timurkan et al. 2018).

In this study, virus isolation was performed in 4/32 (12.5%) of fecal samples of dogs showing signs of diarrhea. The positivity rate obtained by other studies using fecal, pneumonic lung, and nasal-oropharynx swab samples were 9.17%, 2.9%, 16%, and 12.7%, respectively (Mochizuki et al. 2008; Posuwan et al. 2010; Yoon et al. 2010). In addition, it was observed that CAV-2 isolation and identification data, the reproduction time, and the CPE feature of the MDCK cell culture were similar to other researchers' results (Ditchfield et al. 1962;

Chaturvedi et al. 2008). Besides, the titers of CAV-2 were found $10^{-6.0}$, $10^{-6.5}$ and $10^{-6.75}$ TCID₅₀/ml, which were among the titers obtained ($10^{-4.0}$ - $10^{-7.5}$ TCID₅₀/ml) in other studies (Hu et al. 2001; Chaturvedi et al. 2008; Yang et al. 2020).

For diagnosing and differentiating CAV-1 and CAV-2, primers specific to the E3 region were used. For this purpose, four strains isolated in MDCK were tested in PCR and obtained positive in terms of CAV-2 nucleic acid. Parthiban et al. (2009) were gathered CAV-1 PCR amplicon from fecal samples of dogs however only CAV-2 was detected in this study. After all, it is known that the prevalence of CAV-2 in dogs is higher than CAV-1 (Balboni et al. 2014).

Timurkan et al. (2018) detected 2.5% CAV-2 nucleic acid by PCR from nasal swab samples collected from the eastern part of Turkey. As a result of DNA partial sequence analysis, it has been reported that the nine aa differences were obtained between Turkey and America-Europe strains. On the other hand, they were found to be very similar to China strain. Therefore, they were located in the same branch in the phylogenetic tree. For 10 positions, the same aa substitutions were observed in all Turkey strains in contrast to the America-Europe strains (empty boxes in Figure 4). Unlike Timurkan et al. (2018), seven aa substitutions of MW811327-MW811330 strains were seemed to be the same as America-Europe strains (grey boxes in Figure 4). Both Shannon entropy values and ConSurf scores were determined as high in the aa substitution positions of 15, 97, 126, 142, 152, 221, and 250 in Turkey strains. This may be the reason of Turkey branch is divided into two (Figure 3). The strains were grouped not only according to their location (eastern and western Turkey) but also due to body systems (respiratory and gastro-intestinal) in which they were sampled. Two different studies conducted in India pointed out some mutations have occurred in the genome. One of them detected insertion of a residue in the Indian CAV-2 strain that caused a frameshift, and the other one reported nine predominant mutations (Chander et al. 2021; Raja et al. 2021). Besides, in one study performed in red foxes in Italy, two genetically different CAV-2 strains were gathered from the same fox (in phylogenetic tree accession no: JX416841, JX416842) revealed the circulation of the different viral strains among the fox population (Balboni et al. 2013). Accordingly, it could conclude that the genetically different CAV-2 strains circulated in dog populations in Turkey for the last ten years.

While struggling with canine adenovirus infections vaccines have been widely used for many years. After the CAV-1 vaccination corneal edema could be seen. Therefore, the CAV-2 vaccine is preferred for cross-protection and has the advantage that it does not cause side effects like CAV-1. The positive effect of the vaccine has been described elsewhere (Abdelmagid et al. 2004; Barthold et al. 2011; Andrukonis et al. 2021). In Turkey, a programmed vaccination against adenoviral infections is not carried out and imported vaccines are made at the request of animal owners in private clinics. It is shown that one of the vaccine strains and the local CAV-2 isolates are located in different subgroups. It is well known that E3 protein plays an essential role in eliciting immunity by directly associated with class I major histocompatibility complex, tumor necrosis factor, and T-cell response (Kvist et al. 1978; Gooding et al. 1991; Zhang et al. 1991). Amino acid substitutions seen in the E3 gene region in strains raise the question of whether vaccine strains should be updated. However, genetic differences must be shown antigenically. According to our results, it is necessary to examine the protection of the vaccines used in Turkey with the local strains.

In conclusion, this study pointed out the possible genetic heterogeneity among CAV-2 in Turkey. This situation should be revealed clearly by examination of more samples from a wider area. In addition, investigating hexon and fiber genes will help to obtain more valuable data.

Acknowledgment: Authors thank to Ministry of Agriculture and Forestry General Directorate of Food and Control.

Ethical Statement: As these samples were sent to the PVCI in 2011 for the purpose of diagnosis, no ethical approval was required.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Abdelmagid OY, Larson L, Payne L, Tubbs A, Wasmoen T, Schultz RR. (2004) Evaluation of the efficacy and duration of immunity of a canine combination vaccine against virulent parvovirus, infectious canine hepatitis virus, and distemper virus experimental challenges. *Vet Ther.* 5, 173-186.
- Andrukonis A, Brown KM, Hall NJ, Protopopova A. (2021) Intake vaccinations reduced signs of canine respiratory disease during an outbreak at an animal shelter. *Front Vet Sci.* 8, 627580. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.627580>
- Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. (2010) ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 38 (Web Server issue): W529-W533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq399>
- Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. (2016) ConSurf 2016: An improved methodology to estimate and

- visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 44 (W1): W344-W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
- Balboni A, Verin R, Morandi F, Poli A, Prosperi S, Battilani M. (2013) Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Vet Mic.* 162, 551-557. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.015>
- Balboni A, Mollace C, Giunti M, Dondi F, Prosperi S, Battilani M. (2014) Investigation of presence of canine adenovirus (CAV) in owned dogs in Northern Italy. *Res Vet Sci.* 97, 631-636. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.10.010>
- Barthold SW, Lairmore MD, Bowen RA, Parrish CR, Hedrick RP, Saif LJ, Knowles DP, Swayne DE. (2011) Adenoviridae. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. eds. *Fenner's Veterinary Virology*. Fourth edition. Academic Press, United States, p. 203-212.
- Benetka V, Weissenböck H, Kudielka I, Pallan C, Rothmüller G, Mostl K. (2006) Canine adenovirus type 2 infection in four puppies with neurological signs. *Vet Rec.* 158, 91-94. <https://doi.org/10.1136/vr.158.3.91>
- Bulut O, Yapıcı O, Avci O, Simsek A, Atli K, Dik I, Yavru S, Hasırcıoğlu S, Kale M, Mamak N. (2013) The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. *Scientific World Journal.* 587024. <https://doi.org/10.1155/2013/587024>
- Buonavoglia C, Martella V. (2007) Canine respiratory viruses. *Veterinary Research.* 38, 355-373. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006058>
- Can Şahna K, Aslan Ö. (2015) Köpek idrar ve plazma örneklerinde canine adenovirus (CAV) antijeninin ELISA ile araştırılması. *Harran Univ Vet Fak Dergisi.* 4, 45-47 (in Turkish with an abstract in English)
- Celniker G, Nimrod G, Ashkenazy H, Glaser F, Martz E, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. (2013) ConSurf: Using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. *Isr J Chem.* 53, 199-206. <https://doi.org/10.1002/ijch.201200096>
- Chander, V., Sharma, G.K., Bhatt, M., Nandi S, Mahajan S, Singh M, Mahendran K, Karikalan M, Pawde AM, Gupta V, Singh KP, Rajak KK, Gupta VK, Singh RK. (2021) Isolation and genetic characterization of canine adenovirus type 2 from a domestic dog showing neurological symptoms. *Braz J Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00540-0>
- Chaturvedi U, Tiwari AK, Ratta B, Ravindra PV, Rajawat YS, Palia SK, Rai A. (2008) Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 149, 260-263. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.024>
- Cunha RDS, Silva Junior CL, Costa CA, de Aguiar HM, Junqueira Júnior DG. (2020) Comparison of immunity against canine distemper, adenovirus and parvovirus after vaccination with two multivalent canine vaccines. *Vet Med Sci.* 6, 330-334. <https://doi.org/10.1002/vms3.274>
- Damián M, Morales E, Salas G, Trigo FJ. (2005) Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. *J Comp Pathol.* 133, 289-93. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.005>
- Day MJ, Carey S, Clercx C, Kohn B, Marsillo F, Thiry E, Freyburger L, Schulz B, Walker DJ. (2020) Aetiology of canine infectious respiratory disease complex and prevalence of its pathogens in Europe. *J Comp Pathol.* 176, 86-108. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.02.005>
- Ditchfield J, Macpherson LW, Zbitnew A. (1962) Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel Cough"): A preliminary report. *Can Vet J.* 3, 238-247.
- Erls K, Dubovi EJ, Brooks HV, Brownli J. (2004) Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol.* 42, 4524-4529. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4524-4529.2004>
- Gooding LR, Ranheim TS, Tollefson AE, Aquino L, Duerksen-Hughes P, Horton TM, Wold WMS. (1991) The 10,400 and 14,500 dalton proteins encoded by region E3 of adenoviruses function together to protect many but not all cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J Virol.* 65, 4114-4123. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4114-4123.1991>
- Gür S, Acar A. (2009) A retrospective investigation of canine adenovirus (CAV) infection in adult dogs in Turkey. *J S Afr Vet Assoc.* 80, 84-86. <https://doi.org/10.4102/jsava.v80i2.176>
- Hamelin C, Jouvence P, Assaf R. (1985) Association of a type-2 canine adenovirus with an outbreak of diarrhoeal disease among a large dog congregation. *J Diarrhoeal Dis Res.* 3, 84-87.
- Hamir AN, Raju N, Rupprecht CE. (1992) Experimental oral administration of canine adenovirus (type 2) to raccoons (*Procyon lotori*). *Vet Pathol.* 29, 509-513. <https://doi.org/10.1177/030098589202900604>
- Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z. (2001) Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet Res Commun.* 25, 77-84. <https://doi.org/10.1023/a:1006417203856>
- Kärber G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f Experiment Pathol U Pharmakol.* 162, 480-483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>
- Kim SH, Huh JH, Bae SY, Kim JS, Yoon SY, Lim CS, Cho Y, Kim YK, Lee KN, Lee CK. (2006) Epidemiology of respiratory viral infection in 2004-2006. *The Korean J Lab Med.* 26, 351-357. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2006.26.5.351>
- Kvist S, Ostberg L, Persson H, Philipson L, Peterson PA. (1978) Molecular association between transplantation antigens and cell surface antigens in adenovirus-transformed cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 5674-5678. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5674>
- Macartney L, Cavanagh HM, Spibey N. (1988) Isolation of canine adenovirus-2 from the faeces of dogs with enteric disease and its unambiguous typing by restriction endonuclease mapping. *Res Vet Sci.* 44, 9-14.
- Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T, Ohuchi A, Ishida T. (2008) Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J Vet Med Sci.* 70, 563-569. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.563>
- Mohammadi A, Masoudian M, Nemati Y. (2011) Evaluation of PCR techniques for detection and differentiation of canine adenoviruses in faecal samples in Shiraz, Iran. *Iran Bulg J Vet Med.* 14, 247-251.
- Parthiban M, Kumanan K, Sunder K, Senthil Kumar S, Kathiresan D. (2009) Molecular detection of canine adenovirus using polymerase chain reaction and sequencing. *TNJVAS.* 5, 140-142.
- Posuwan N, Payungporn S, Thontiravong A, Kitikoon P, Amonsin A, Poovorawan Y. (2010) Prevalence of respiratory viruses isolated from dogs in Thailand during 2008-2009. *Asian Biomed.* 4, 563-569. <https://doi.org/10.2478/abm-2010-0071>
- Raja P, Sachin V, Parthiban M, Janaki PA. (2021). Molecular characterization of canine adenovirus type 2 in dogs from India. *Virus Dis.* 32, 369-374. <https://doi.org/10.1007/s13337-021-00690-7>
- Shannon CE. (1948) The mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J.* 27, 379-423 & 623-656. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Spearman C. (1908) The method of "right and wrong cases" (constant stimuli) without Gauss's formula. *Br J Psychol.* 2, 227-242. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x>
- Timurkan MO, Aydin H, Alkan F. (2018) Detection and molecular characterization of canine adenovirus type-2 (CAV-2) in dogs with respiratory tract symptoms in shelters in Turkey. *Veterinarski Arhiv.* 88, 467-479. <https://doi.org/doi:10.24099/vet.arhiv.0052>
- Universidad Complutense de Madrid, Protein Variability Server ([online]). Access address: Website <http://imed.med.ucm.es/PVS/> Date of access: Accessed 18 April 2021.
- Yang DK, Kim HH, Yoo JY, Ji M, Han BH, Oh S, Hyun BH. (2020) Immunogenicity of a new, inactivated canine adenovirus Type-2 vaccine for dogs. *Clin Exp Vaccine Res.* 9, 40-47. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.1.40>
- Yıldırım Y, Kırmızıgül AH, Gökçe E. (2009) Seroprevalence of canine adenovirus (CAV) infection in Kars dogs in Turkey. *YYU Vet Fak Derg.* 20, 37-39.
- Yoon SS, Byun JW, Park YI, Kim MJ, Bae YC, Song JY. (2010) Comparison of the diagnostic methods on the canine adenovirus type-2 infection. *Basic Appl Pathol.* 3, 52-56. <https://doi.org/10.1111/j.1755-9294.2010.01073.x>
- Zhang XL, Bellett AJ, Hla RT, Braithwaite AW, Müllbacher A. (1991) Adenovirus type 5 E3 gene products interfere with the expression of the cytolytic T cell immunodominant E1a antigen. *Virology.* 180, 199-206. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90024-6)



Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa

Tansu Bıçakcıođlu¹, Şimal Yörük², Hamit Kaan Müştak³

^{1,2,3} Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 28.08.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 14.12.2021

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is an important pathogen that is frequently isolated from otitis cases in dogs, known to have high intrinsic and acquired resistance mechanisms to resist most antibiotics, and the ability to develop multiple antibiotic resistance. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance profile of *P. aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa symptoms. Totally 43 (26.70%) *P. aeruginosa* strains were isolated from 170 ear swab samples and all these strains were subjected to disk diffusion susceptibility testing and the resistance profiles of the strains were found to be as follows; 100% to trimethoprim sulfamethoxazole, 93.02% to doxycycline, 79.06% to neomycin, 58.13% to oxytetracycline, 34.88% to enrofloxacin, 25.58% to tobramycin, 20.93% to gentamicin, 13.95% to ciprofloxacin, 9.30% to amikacin, 4.65% to polymyxin B. Furthermore, multiple antibiotic resistance was detected in a total of 17 (39.53%) *P. aeruginosa* strains. As a result, it was understood that the most common Gram-negative bacteria isolated from otitis externa cases of dogs was *P. aeruginosa* and these isolates have shown high resistance to antibiotics from many antibiotic groups.

Keywords: Antibiotic resistance, Dog, Otitis externa, *Pseudomonas aeruginosa*.

Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profilleri

Özet: *Pseudomonas aeruginosa*, köpeklerin otitis vakalarından sıklıkla izole edilen bir patojendir ve çoğu antibiyotiğe karşı birçok içsel ve edinilmiş direnç mekanizmasına sahip, çoklu antibiyotik direnci geliştirme kabiliyeti olduğu bilinen bir bakteridir. Bu çalışmanın amacı, otitis eksterna semptomları gösteren köpeklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesidir. 170 kulak sürüntüsü örneğinden toplam 43 (%26,70) *P. aeruginosa* suşu izole edildi ve bu suşların tümü disk difüzyon duyarlılık testine tabi tutuldu. İzole edilen *P. aeruginosa* suşlarının direnç profilleri trimetoprim sülfametoksazole %100, doksisisikline %93,02, neomisine %79,06, oksitetrasikline %58,13, enrofloksasine %34,88, tobramisine %25,58, gentamisine %20,93, siprofloksasine %13,95, amikasine %4,30, polimiksin B'ye %4,65 şeklinde bulundu. Ayrıca toplam 17 (%39,53) *P. aeruginosa* suşunda çoklu antibiyotik direnci saptandı. Sonuç olarak köpeklerin otitis eksterna vakalarından en sık izole edilen Gram-negatif bakterinin *P. aeruginosa* olduğu ve bu izolatların farklı gruplardan antibiyotiklere yüksek direnç gösterdiği anlaşıldı.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, Köpek, Otitis eksterna, *Pseudomonas aeruginosa*.

Introduction

Otitis externa is an acute or chronic inflammation of the external ear canal. The incidence of otitis externa in small animal medicine is around 20% (Cole 2004). Infectious otitis externa which is a multifactorial disease; arise as secondary complications of primary or predisposing causes such as atopic dermatitis, chronic irritation, conformational disorders, excessive moisture, obstructive causes, foreign bodies, metabolic diseases, ectoparasites, keratinization disorders (Graham-Mize and Rosser 2004).

The infectious agents that cause otitis externa are mostly bacteria, yeast and fungi (Shaw 2016). *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*,

Streptococcus spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. are the most common bacterial agents that are frequently isolated from canine bacterial otitis externa cases (Petrov et al. 2013; Lee et al. 2019). Among yeasts such as *Malassezia pachydermatis* and *Candida* spp. are also frequently isolated from canine otitis externa cases with or without bacterial agents (Blanco et al. 2000; Yapicier et al. 2018).

P. aeruginosa is the most frequently isolated Gram-negative bacteria in canine otitis externa cases. *P. aeruginosa* is a rod shaped, aerobic, opportunistic bacteria which is frequently found in many environments such as soil, water, organic material and

is not found in the normal ear flora of dogs (Morris et al. 2017; Pye 2018).

P. aeruginosa is intrinsically resistant to many antibiotic groups. This intrinsic resistance can be associated with different mechanisms such as low outer membrane permeability, chromosomal AmpC β -lactamase production, and the presence of a large number of genes encoding efflux pumps that cause multiple antibiotic resistance (Hancock 1998). *P. aeruginosa* may have resistance to most of penicillin, β -lactam group antibiotics, often aminoglycoside antibiotics, chloramphenicol and tetracyclines (Me-kić et al. 2011; Penna et al. 2011).

Antibiotic resistance is a remarkable problem in both public and animal health. Increasing incidence of *P. aeruginosa* with increased intrinsic resistant strains and multiple antibiotic resistance makes it difficult to select antibiotics for treatment (Rubin et al. 2008; Pye 2018). Groups of antibiotics routinely used against *P. aeruginosa* infections in small animal medicine include aminoglycosides, fluoroquinolones, polymyxins, tetracyclines and potentiated sulfonamides (Martino De et al. 2016; Pye 2018). Making the selection of antibiotics used in the treatment according to the results of antibiotic susceptibility testing provides the increasing success of treatment regimes.

In this study, it was aimed to determine the prevalence of *P. aeruginosa* in otitis externa cases and the resistance of the strains against routinely used antibiotics.

Material and Method

Sample Collection

In this study, swab samples taken from the outer ear canal of 170 dogs with a clinical diagnosis of otitis externa sent from 13 veterinary clinics in the Ankara region between September 2019 and December 2020 were used. The selection of the dogs participating in the study was made by physical aural examination (head shaking, aural hyperemia and pruritus, discharge from the ear canal, unpleased odor, erythema, trauma due to scratching itself, pain on palpation, alopecia, ulceration, etc.) and otoscopic examination findings. Specimens were collected from the external ear canal of dogs using Amies Agar Gel Swabs (Oxoid, Hampshire, UK). The samples taken into the transport medium were kept at 4°C until maintained and processed within 24 hours. The swab samples have been examined in terms of both bacteriological and mycological aspects. *P. ae-*

ruginosa AUVFM-07/01 strain obtained from Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology Culture Collection was used as positive control in all tests.

Bacteriological and Mycological Examination

In bacteriological examination, specimens which obtained using sterile swabs were inoculated on blood agar containing 5% sheep blood, MacConkey (MC) Agar (Oxoid CM0115) and Eosin Methylene Blue (EMB) agar (Oxoid CM0069B) and incubated at 37°C for 24-48 hours under aerobic conditions. Colonies were Gram stained and inspected according to their macroscopic and microscopic morphology. Alongside, biochemical tests such as catalase, oxidase, lactose fermentation, coagulase, indole, methyl red, Voges-Proskauer, citrate, urease, oxidation/fermentation tests were performed to identify genus and species. Cystine-Lactose-Electrolyte Deficient (CLED) Agar (Oxoid CM0301) was also used as a differential agar for the identification of pyocyanin formation of *P. aeruginosa*. Isolates were identified at the genus and species level using staining, biochemical tests and differential mediums (Holt et al. 1994; Quinn et al. 1994).

For mycological examination, collected swabs were inoculated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid CM0041) and incubated at 25°C for 2-4 weeks in an aerobic environment and colonies were controlled daily. Inoculations were also made on Chromogenic Candida agar (Oxoid CM1002) to differentiate *Candida* species in yeast isolations and incubated at 37-42°C for 48 hours. Mycological diagnosis was made by examining the incubation time and macroscopic/microscopic morphology of the colonies. In macroscopic examination, colonies were examined by considering their pigmentation and structure. In microscopic examination, colonies were stained with lactophenol cotton blue solution using cellophane tape method (Ghannoum and Is-ham 2009). Microscopically, hypha, septum, macroconidium, microconidium and spore structures belonging to fungal colonies were examined and diagnosed by classical mycological culture methods (Holt et al. 1994; Quinn et al. 1994).

Antibiotic Susceptibility Testing

Antibiotic susceptibility test was performed by the disk diffusion method recommended by Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI 2019). *P. aeruginosa* strains identified by conventional methods were inoculated on Mueller-Hinton (MH) agar (Oxo-

id CM0337). Antimicrobial susceptibility test disks (Oxoid, Hampshire, UK); gentamicin (CN10 µg), oxytetracycline (OT 30 µg), tobramycin (TOB 10 µg), polymyxin B (PB 300 U), enrofloxacin (ENR 5 µg), neomycin (N 30 µg), trimethoprim sulfamethoxazole (SXT 25 µg, 1.25 µg-23.75 µg), doxycycline (DO 5 µg), ciprofloxacin (CIP 5 µg), amikacin (AK 30 µg) were used. Agar plates were incubated at 37°C for 18-24 hours and inhibition zone diameters were measured for each disk according to CLSI standards (CLSI 2019; CLSI 2020). *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was used as positive control in all tests. *P. aeruginosa* strains were defined as multi-drug resistant (MDR) in the case of resistance to one or more antibiotics from at least three different antibiotic groups (Magiorakos et al. 2012).

Results

Bacterial and Mycological Examination Results

No growth was observed in 9 (5.2%) of the 170 swab samples. *Staphylococcus* spp. (40.37%), *P. aeruginosa*

(26.70%), *Streptococcus* spp. (18.01%), *E. coli* (4.96%), *Proteus* spp. (4.34%), *Corynebacterium* spp. (3.10%) and *Enterococcus* spp. (1.86%) were isolated among 161 samples.

Fungi and yeast growth were observed in 58 (34.11%) of 170 ear swab samples. According to the results 38 (65.51%) *Malassezia* spp., 11 (18.96%) *Candida albicans*, 5 (8.62%) *Aspergillus* spp. and 4 (6.89%) *Penicillium* spp. were isolated.

Antimicrobial Susceptibility Test Results

Among 43 *P. aeruginosa* strains; 43 (100%) of them were found resistant to trimethoprim sulfamethoxazole, 40 (93.02%) to doxycycline, 34 (79.06%) to neomycin, 25 (58.13%) to oxytetracycline, 15 (34.88%) to enrofloxacin, 11 (25.58%) to tobramycin, 9 (20.93%) to gentamicin, 6 (13.95%) to ciprofloxacin, 4 (9.3%) to amikacin and 2 (4.65%) to polymyxin B (Table 1). Some of these resistant strains of *P. aeruginosa* were found resistant to antibiotics from two or more antibiotic groups. Multiple antibiotic resistance profiles have been shown in Table 2.

Table 1. Antimicrobial resistance profiles of *P. aeruginosa* strains.

Antimicrobial Classes	Antimicrobial Agents	Number of Isolates (n =43)	Zone diameter breakpoint for resistant strains (mm)	Resistance (%)
Fluoroquinolones	CIP ^b	6	≤15	13.95
	ENR ^a	15	≤16	34.88
	AK ^a	4	≤14	9.3
Aminoglycosides	CN ^a	9	≤12	20.93
	TOB ^b	11	≤12	25.58
	N ^a	34	≤17	79.06
Polymyxins	PB ^b	2	≤11	4.65
Tetracyclines	DO ^b	40	≤18	93.02
	OT ^b	25	≤18	58.13
Sulfonamides	SXT ^b	43	≤23	100

n: Total number of isolates tested. AK: Amikacin, ENR: Enrofloxacin, N: Neomycin, OT: Oxytetracycline, TOB: Tobramycin, CN: Gentamicin, DO: Doxycycline, SXT: Trimethoprim-sulfamethoxazole, CIP: Ciprofloxacin, PB: Polymyxin B.

^a Zone diameter breakpoints according to Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard Document 5th ed. CLSI supplement VET01S (CLSI, 2020).

^b Zone diameter breakpoints according to Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA ABD (CLSI, 2019).

Table 2. Multiple antibiotic resistance profiles of *P. aeruginosa* strains.

Multidrug Resistance Profiles	No. of MDR Isolates	Prevalence of MDR Isolates
DO, SXT, N, ENR, OT	2	4.6
DO, SXT, N, ENR, AK	1	2.3
DO, SXT, N, PB, CN	1	2.3
DO, SXT, N, ENR	3	6.9
DO, SXT, N, OT	5	11.6
DO, SXT, N, AK	1	2.3
DO, SXT, OT, TOB	2	4.6
SXT, TOB, CIP, CN	2	4.6
Total:	17	39.5

Antimicrobial agent groups: Tetracyclines: DO, OT; Fluoroquinolones: ENR, CIP; Aminoglycosides: AK, CN, N, TOB; Sulfonamides: SXT; Polymyxins: PB.

Discussion and Conclusion

Otitis externa cases in dogs can occur due to primary and secondary causes (Shaw 2016; Pye 2018). It was thought that the 9 swab samples with no growth were considered to be according to primary non-infectious causes such as allergic conditions, autoimmune disorders, hormonal disorders, and obstructive causes. The most common bacterial agents isolated from otitis externa cases of dogs belong to *Staphylococcus* spp. (Blanco et al. 2000; Turkyilmaz 2008; Penna et al. 2011; Petrov et al. 2013; Bajwa 2019). In this study, the prevalence of *Staphylococcus* spp. from dogs with otitis externa was determined as 40.37%. This result supports the idea that *Staphylococcus* spp. is the most common bacteria isolated from dogs with otitis externa, as reported in other studies (Petrov et al. 2013; Paterson 2016; Korbelik et al. 2019). *P. aeruginosa* is not found in the normal ear flora of dogs, but it is frequently isolated from canine otitis cases. In this study, prevalence of *P. aeruginosa* (26.7%) was found to be high which is similar to Hariharan et al. (17.5%) (2006), Turkyilmaz (17%) (2008), Bugden (35.5%) (2013), Petrov et al. (17%) (2013), Bourély et al. (27.5%) (2019) and Dos Santos et al. (27.6%) (2019) findings.

P. aeruginosa is frequently isolated from otitis cases and treatment is often unsuccessful due to its high antimicrobial resistance (Ghannoum and Isham 2009; Mekić et al. 2011; Bourély et al. 2019; Chan et al. 2019). This is explained by the knowledge that *P. aeruginosa* is a bacterium that has an intrinsic antibiotic resistance mechanism and can exhibit MDR and can also easily develop resistance to new antibiotics (Hancock 1998). It is known that *P. aeruginosa*

has high intrinsic resistance to tetracycline, sulphonamide and quinolone group antibiotics (Mekić et al. 2011; Penna et al. 2011; Arais et al. 2016). In this study, all *P. aeruginosa* strains were found to be resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole from the sulfonamide group among the antibiotics tested from five different groups. In similar studies, Schick et al. (69%) (2007), Rubin et al. (57%) (2008), Ozturk et al. (100%) (2016) and Turkyilmaz (100%) (2008) reported that *P. aeruginosa* was highly resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole.

In this study, *P. aeruginosa* strains resistant to oxytetracycline (58.1%) from tetracycline group is very similar to the findings of Ozturk et al. (50%) (2016) and the resistance to doxycycline (93%) is very similar to the findings of Martino et al. (78.3%) (2016) and Petrov et al. (78.3%) (2013).

The resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics from the aminoglycoside group is provided by the inactivation of the antimicrobial agents by bacterial modifying enzymes (34). In this study, 90.7% *P. aeruginosa* strains were found to be susceptible to amikacin. Petrov et al. (100%) (2013), Schick et al. (81%) (2007) and Park et al. (97.8%) (2020) also found high sensitivity to amikacin in their studies. In this study, *P. aeruginosa* exhibited the highest sensitivity to amikacin among the aminoglycoside antibiotics tested. This is attributed to the opinion that amikacin has a low sensitivity to modifying enzymes, which is also reported in the literature (Poole 2005; Ekincioglu and Percin 2013).

Enrofloxacin is more lipophilic than ciprofloxacin (Davis et al. 2007). Therefore, efflux pumps, which are important in the elimination of fluoroquinolones, are known to more easily eliminate enrofloxacin (Wildermuth et al. 2007). Rubin et al. (2008) reported that *P. aeruginosa* strains isolated from dogs with diseases such as otitis, pyoderma, and soft tissue infections had 31% resistance to enrofloxacin and 16% resistance to ciprofloxacin. In this study, prevalence of resistance to enrofloxacin and ciprofloxacin was found to be 34.8% and 13%, respectively. Similar to this study, Park et al. (2020) reported that *P. aeruginosa* was more resistant to enrofloxacin than ciprofloxacin, thus supporting the view that *P. aeruginosa* exhibited higher resistance to enrofloxacin than ciprofloxacin.

P. aeruginosa strains isolated in this study exhibited high sensitivity (95.4%) to polymyxin B that has also been reported similarly in other studies (Tam et al. 2005; Bugden et al. 2013; Pye et al. 2013; Hyun et al. 2018). Polymyxin B is one of the limited

antibiotic options that can be used in the treatment of infections caused by Gram negative bacteria and especially *P. aeruginosa* that exhibit MDR, and is often preferred against *P. aeruginosa* in cases of otitis externa (Tam et al. 2005; Petrov et al. 2013). *P. aeruginosa* exhibits a very low intrinsic resistance to polymyxin B compared to other antibiotics and it is known that its ability to develop mutational resistance is limited (Fernández et al. 2013).

In this study, MDR prevalence (39.53%) of *P. aeruginosa* strains was found to be similar to the MDR prevalence of the studies reported by Dos Santos et al. (61.9%) (2019) and Eliasi et al. (92%) (2020). In these studies, sulphonamide, tetracycline, fluoroquinolone and aminoglycoside group antibiotics, which are known to exhibit intrinsic resistance in *P. aeruginosa*, were found at high levels in MDR profile combinations (Turkyilmaz 2008; Eliasi et al. 2020). In addition, the ability of *P. aeruginosa* to develop acquired resistance also contributes to the formation of MDR (Pang et al. 2019).

As a result, in this study which was conducted in the Ankara region, it was confirmed that the most common Gram-negative bacteria causing otitis externa in dogs was *P. aeruginosa*. In this study, it was observed that the resistance profile of *P. aeruginosa* strains isolated from otitis externa cases of dogs against antibiotics selected from antibiotic groups known to have resistance was consistent with similar studies. For a successful treatment of otitis externa in this region, it was thought that antibiotics such as amikacin and polymyxin B, which *P. aeruginosa* strains showed low resistance, could be preferred instead of trimethoprim-sulfamethoxazole, doxycycline and oxytetracycline, which *P. aeruginosa* strains show high resistance. The high prevalence of multiple antibiotic resistant strains emphasizes once again the importance of antibiotic susceptibility testing in the selection of antibiotics for treatment.

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

Ethical Statement: The materials used in this study are swab samples collected during clinical examination.

References

- Arais LR, Barbosa AV, Carvalho CA, Cerqueira AM. (2016) Antimicrobial resistance, integron carriage, and gyrA and gyrB mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. *Vet Dermatol.* 27(2), 113-7e31. DOI: 10.1111/vde.12290.
- Bajwa J. (2019) Canine otitis externa - Treatment and complications. *Can Vet J.* 60(1), 97-99.
- Blanco JL, Guedeja-Marron J, Blanco I, Garcia ME. (2000) Optimum incubation conditions for the isolation of yeasts from canine otitis externa. *J Vet Med Ser B.* 47(8), 599-605. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2000.00390.
- Borum AE, Cecen G, Demir G, Cetin C, Senturk S. (2014) Determination and Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from Otitis Externa with Dogs. *Kocatepe Vet J.* 7(1), 27-31. DOI: 10.5578/kvj.7337
- Bourély C, Cazeau G, Jarrige N et al. (2019) Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiol Infect.* 147, e121, 1-10. DOI: https://doi.org/10.1017/S0950268818003278
- Bugden DL. (2013) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Aust Vet J.* 91(1-2), 43-46. DOI: 10.1111/avj.1200
- Chan WY, Khazandi M, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB. (2019) In vitro antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. *Vet Dermatol.* 30, 133-e38. DOI: https://doi.org/10.1111/vde.12712
- CLSI. (2020) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard Document 5th ed. CLSI supplement VET01S.
- CLSI. (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA ABD.
- Cole LK. (2004) Otoloscopic evaluation of the ear canal. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 34(2), 397-410. DOI: 10.1016/j.cvs.2003.10.004.
- Davis JL, Foster DM, Papich MG. (2007) Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *J Vet Pharmacol Ther.* 30(6), 564-71. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2007.00914.x.
- Dos Santos JP, Júnior ÁF, Locce CC, Brasília SC, Bittar ER, Bittar JFF. (2019) Effectiveness of tobramycin and ciprofloxacin against bacterial isolates in canine otitis externa in Uberaba, Minas Gerais. *Cienc Anim Bras.* 20, 8-9. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v20e-52164
- Ekincioglu P, Percin D. (2013) Antibiotic Susceptibilities of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences).* 22(2), 141-149. DOI: https://doi.org/10.5505/abantmedj.2015.38981
- Eliasi UL, Sebola D, Oguttu JW, Qekwana DN. (2020) Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine clinical cases at a veterinary academic hospital in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 22; 91(0), e1-e6. DOI: 10.4102/jsava.v91i0.2052.
- Fernández L, Álvarez-ortega C, Wiegand I. et al. (2013) Characterization of the Polymyxin B Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1), 110-119. DOI: 10.1128/AAC.01583-12
- Ghannoum MA, Isham NC. (2009) Clinical Mycology. 2nd ed., 375-384. Dermatophytes and dermatophytoses.
- Graham-Mize CA, Rosser EJ. (2004) Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. *J Am Anim Hosp Assoc.* 40(2), 102-108. DOI: 10.5326/0400102
- Hancock REW. (1998) Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 27(1), 93-S99. DOI: 10.1086/514909.

- Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. (2006) Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J.* 47(3), 253-255.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Ninth Edition). Williams & Wilkins. Baltimore.
- Hyun JE, Chung TH, Hwang CY. (2018) Identification of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with pyoderma and otitis in Korea. *Vet Dermatol.* Jun;29(3):186-e68. doi: 10.1111/vde.12534.
- Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. (2019) Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Veterinary Dermatology.* 30(3), 228-e70. DOI: <https://doi.org/10.1111/vde.12734>
- Lee GY, Lee HH, Hwang SY, Hong J, Lyoo KS, Yang SJ. (2019) Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. *J Vet Sci.* 20(2): e6. DOI: 10.4142/jvs.2019.20.e6.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. (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), 268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Martino De L, Nocera FP, Mallardo K et al. (2016) An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pac J Trop Biomed.* 6(5), 384-389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.11.012>
- Mekić S, Matanović K, Šeol B. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet Rec.* 169(5), 125. DOI: 10.1136/vr.d2393
- Morris DO, Davis MF, Palmeiro BS, O'Shea K, Rankin SC. (2017) Molecular and epidemiological characterization of canine *Pseudomonas* otitis using a prospective case-control study design. *Vet Dermatol.* 28(1), 118-e25. DOI: 10.1111/vde.12347
- Ozturk D, Pehlivanoglu F, Turutoglu H, Sirin YS, Sababoglu E. (2016) Isolation and antibiotic susceptibility of microorganisms from dogs with otitis externa. *Eurasian J Vet Sci.* 32(2), 84-88. DOI: 10.1111/avj.12007
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances.* 37(1), 177-192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Park Y, Oh J, Park S, Sum S, Song W, Chae J, Park H. (2020) Antimicrobial resistance and novel mutations detected in the gyrA and parC genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from companion dogs. *BMC Vet Res.* Apr 15;16(1):111. doi: 10.1186/s12917-020-02328-0.
- Paterson S. (2016) Discovering the causes of otitis externa. *In Practice.* 38, 7-11. DOI: 10.1136/inp.i470
- Penna B, Thomé S, Martins R, Martins G, Lilenbaum W. (2011) In vitro Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Canine Otitis Externa in Rio De Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 42, 1434-1436. DOI: 10.1590/S1517-838220110004000027
- Petrov V, Mihaylov G, Tsachev I, Zhelev G, Marutsov P, Koev K. (2013) Otitis externa in dogs: Microbiology and antimicrobial susceptibility. *Rev Med Vet (Toulouse).* 164(1), 18-22.
- Poole K. (2005) Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(2), 479-87. DOI: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.
- Pye C. (2018) *Pseudomonas* otitis externa in dogs. *Dermatologie Vétérinaire.* 59, 1231-1234. PMID: 30410185. PMCID: PMC6190182.
- Pye CC, Yu AA, Weese JS. (2013) Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Vet Dermatol.* 24(4), 1-6. DOI: 10.1111/vde.12040
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. (1994) *Clinical Veterinary Microbiology.* 237-242. London: Wolfe/Mosby.
- Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Zhao S. (2008) Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol.* 131(1-2), 164-172. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.02.018
- Schick AE, Angus JC, Coyner KS. (2007) Variability of laboratory identification and antibiotic susceptibility reporting of *Pseudomonas* spp. isolates from dogs with chronic otitis externa. *Vet Dermatol.* 18(2), 120-126. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2007.00581.x
- Shaw S. (2016) Pathogens in otitis externa: Diagnostic techniques to identify secondary causes of ear disease. *In Practice.* 38, 12-16. DOI: <https://doi.org/10.1136/inp.i461>
- Tam VH, Schilling AN, Vo G et al. (2005) Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(9), 3624-3630. DOI: 10.1128/AAC.49.9.3624-3630.2005
- Turkylmaz S. (2008) Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa. *Turkish J Vet Anim Sci.* 32(1), 37-42
- Wildermuth BE, Griffin CE, Rosenkrantz WS, Boord MJ. (2007) Susceptibility of *Pseudomonas* isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *J Am Anim Hosp Assoc.* 43(6), 337-341. DOI: 10.5326/0430337
- Yapicier OS, Sababoglu E, Kaya M, Ozturk D, Pehlivanoglu F, Turutoglu H. (2018) Fungal agents isolated from dogs with otitis externa. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 3(2), 121-124. DOI: 10.24880/maeuofd.463762



Investigation of zoonotic helminths in children's playgrounds in Sivas province

Ufuk Erol^{1*}, Kürşat Altay², Ömer Faruk Şahin³, Osman Furkan Urhan⁴

^{1,2,3}Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, Sivas, Turkey.

⁴General Directory Meat and Milk Board, Sivas Meat Processing Plant, Sivas, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 23.09.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 26.10.2021

Abstract: Human toxocariasis is categorized as a neglected parasitic disease by the Center for Disease Control and Prevention (CDC). The disease is more prevalent in children than adults because children are more frequently exposed to the eggs of *T. canis* and *T. cati* which are the etiological agents of human toxocariasis during playing outside. This study aimed to research the presence of helminth species in children's playgrounds in Sivas using microscopic and molecular techniques. For this purpose, 84 sand samples were taken from 25 children's playgrounds from July 2020 to July 2021. Moreover, 68 stool samples that belong to cats, dogs, and red foxes were collected from and around children's playgrounds. *Toxocara* spp. eggs were found in five sand samples in this study. According to PCR results, *T. cati* was detected in three sand samples while *T. canis* was found in two sand samples. *Toxascaris leonina* was detected only in one dog stool sample, whereas no parasite species were found in cat stool samples. The eggs of *T. canis*, *Acanthocephala*, *T. leonina*, *Capillaria* spp. were found in red fox stool samples. To the best of our knowledge, children's playgrounds were researched for the first time in terms of zoonotic helminth species in Sivas.

Keywords: Children's playgrounds, helminth, PCR, Sivas, zoonosis.

Sivas ilinde çocuk oyun parklarında zoonotik helmintlerin araştırılması

Özet: İnsan toxocariasisi ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından göz ardı edilen bir paraziter hastalık olarak sınıflandırılmaktadır. Hastalık çocuklarda erişkinlere göre daha yaygındır. Çünkü çocuklar dışarıda oyun oynarken insan toxocariasis etiyolojik etkenleri olan *T. canis* ve *T. cati* yumurtalarına daha sık maruz kalmaktadır. Bu çalışmanın amacı Sivas'taki çocuk oyun parklarında helmint türlerinin varlığını mikroskopik ve moleküler teknikler kullanarak araştırmaktır. Bu amaçla Temmuz 2020 ve Temmuz 2021 tarihleri arasında 25 çocuk oyun parkından 84 kum numunesi alınmıştır. Ayrıca çocuk oyun parklarının içinden ve etrafından kedi, köpek ve kızıl tilkilere ait 68 dışkı numunesi toplanmıştır. Bu çalışmada beş kum örneğinde *Toxocara* spp. yumurtası tespit edilmiştir. PZR sonuçlarına göre üç kum örneğinde *T. cati*, iki kum örneğinde *T. canis* tespit edilmiştir. *Toxascaris leonina* sadece bir köpek dışkı örneğinde tespit edilirken, kedi dışkı örneklerinde parazit türü bulunmamıştır. Kızıl tilki dışkı örneklerinde ise *T. canis*, *Acanthocephala*, *T. leonina*, *Capillaria* spp. yumurtaları bulunmuştur. Bildiğimiz kadarıyla Sivas'ta çocuk oyun parkları zoonotik helmint türleri bakımından ilk kez incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Çocuk oyun parkları, helmint, PZR, Sivas, zoonoz.

Introduction

Dogs and cats have lived together with humans since the domestication process and have become the most popular pet animals in the world. However, these animals are abandoned to the streets due to the difficulties faced by their owners such as caring and feeding. The number of these animals increases gradually in the cities, and because of this, public health is threatened by these animals (Robertson and Thompson 2002) since cats and dogs are the definitive hosts of different parasitic pathogens such as *Toxocara canis* and *T. cati* which are the etiological agents of human toxocariasis (Taylor et al. 2016).

Human toxocariasis is assessed to be one of the most important neglected parasitic diseases in the world by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2020). The global seroprevalence of human toxocariasis was ranging from 1.6 to 92.8% (Smith and Noordin 2006). The disease is more prevalent in undeveloped or developing countries than developed countries, due to the high number of companion animals, lack of sanitary conditions, and lack of personal hygiene (Smith and Noordin 2006; Nooraldeen 2015).

Humans become infected with *Toxocara* spp. by ingestion of embryonated eggs from contaminated vegetables, soils, or direct contact with infected cats

Yazışma adresi / Correspondence: Ufuk Erol, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, Sivas, Turkey E-mail: ufukerol@cumhuriyet.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-6766-1335 • ² 0000-0002-5288-1239 • ³0000-0002-3230-504X • ⁴0000-0002-2834-3051

or dogs, and consumption of infective stage larvae present in undercooked organs of paratenic hosts (Despommier 2003; Overgaauw and van Knapen 2013; Taylor et al. 2016). According to the researches, embryonated eggs are generally present in children's playgrounds contaminated with definitive host stool. Therefore, children's playgrounds are considered risky areas for human toxocarosis (Overgaauw and van Knapen 2013). Many different studies were conducted for the determination of *Toxocara* spp. in children's playgrounds in the world (Borecka and Gawor 2008; Nooraldeen 2015; Kleine et al. 2017; Bystrianska et al. 2019; Sadowska et al. 2019) and the determination of zoonotic helminth species in children's playgrounds in Turkey (Oge and Oge 2000; Gürel et al. 2005; Aydenizöz-Özkayhan 2006; Avcioglu and Burgu 2008; Avcioglu and Balkaya 2011; Bozkurt et al. 2012; Aydın 2020). To the best of our knowledge, there is no study on zoonotic helminth diseases in Sivas, although Sivas province has a lot of stray cats and dogs like any other city in Turkey. The present study aimed to determine the presence and distribution of potential zoonotic helminth eggs in children's playgrounds in Sivas province for the first time using microscopic techniques and species-specific PCR for identification of *Toxocara* spp. eggs.

Material and Methods

This research was performed in Sivas province, located in the Central Anatolia Region of Turkey. The average annual temperature of Sivas is 8.9°C, and the average relative humidity is 65%.

From July 2020 to July 2021, sand samples were taken from 25 children's playgrounds, 20 of which were from the city center, and five of which were from recreation areas. A total of 84 sand samples consisted of 60 sand samples collected from city center parks, and 24 sand samples collected from recreation areas. We also collected 68 stool samples belonging to cats (n:19), dogs (n:21), and red foxes (n:28) from and around children's playgrounds during the sampling period. Sand and stool samples were stored at -80°C for seven days for inactivation of possible *Echinococcus* spp. eggs (Hofer et al. 2000).

Approximately 250 g sand samples were collected from 10 cm depth of ground surface into plastic bags from each children's playground. Sand samples were homogenized, and then a 50 g sample was examined in terms of helminth eggs. In the laboratory, sand samples were mixed with distilled

water and 1 mL Tween-40. Homogenized material was vortexed for five minutes and filtered through a 250 µL sieve to remove big particles. Out of 28 mL homogenized material was taken into a 50 mL falcon tube, and 20 mL distilled water was added. The material was centrifuged at 2500×rpm for 3 min. The supernatant was removed and the same volume of distilled water was added to the sediment. This procedure was repeated at least three times. Final sediment was transferred in a centrifuge tube to which saturated ZnSO₄ (33%, density:1.18) solution was added (Kazacos 1983; Avcioglu and Burgu, 2008; Taylor et al. 2016). The homogenized sample was centrifuged at 2500×rpm for 10 minutes. Samples were examined for helminth eggs under a light microscope using 10× and 40× objectives.

Stool samples were examined by using flotation and sedimentation methods as described in detail by Taylor et al. (2016), and Zajac et al. (2012), respectively.

Identification of helminth eggs was performed based on their morphological features such as shape, thickness, and color of the shell (Uga et al. 2000; Taylor et al. 2016).

DNA Extraction from *Toxocara* spp. eggs

The method of genomic DNA extraction from *Toxocara* spp. eggs was performed as described by Dinkel et al. (1998) with little modifications. Some modifications were as follows; *Toxocara* spp. eggs were put in a boiling water bath for one minute and then snap-frozen in a -196°C liquid nitrogen for one minute. These procedures were repeated at least five times. Furthermore, *Toxocara* spp. eggs were incubated at 56°C for 4 hours with proteinase K (Cat No.: P6556, Sigma-Aldrich®, Israel). Total genomic DNA obtained from eggs was stored at -20°C until use.

Molecular Identification of *Toxocara* spp.

The second internal transcribed spacer (ITS-2) of ribosomal DNA (rDNA) gene was amplified with species-specific primers in order for the discrimination of *Toxocara* spp. eggs obtained from sand and stool samples. Further information about primers is given in Table 1.

PCR amplification was performed in a total volume of 50 µL using DNase-RNase-free sterile water (Cat No.: 129114, Qiagen®, Germany), 10× PCR buffer (Thermo Scientific™, Lithuanian), 2.5 mM MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific™, Lithuanian), 200 µM of each dNTP (Cat. No.: DN021-1000, GeneDireX®), 1.25 U of Taq DNA polymerase (Cat. No.: EP0402,

Thermo Scientific™, Lithuanian), 2 µL (10 pmol/µL) of each of the primers, and 5 µL template DNA. The multiplex PCR conditions were as follows; 94°C for 5 min (initial denaturation), followed by 35 cycles of 94°C, 1 min (denaturation), 55°C, 1 min (annealing), 72°C, 1 min (extension), and a final extension of 72°C for 5 min (Li et al. 2007). Sterile deionized water was used as the negative control, and DNA of *T. canis* and *T. cati* which were obtained from adult

nematodes present in our laboratory were used as the positive control in each PCR assay. About 10 µL PCR product were loaded on 1.5% w/v agarose gel, stained with ethidium bromide for screening specific band profile of *T. canis* (~330 bp) and *T. cati* (~660bp). All PCR steps were done in separate rooms to avoid cross-contamination.

Table 1. Primers used in the current research.

Species	Primer	Length of PCR product	Target Gene	References
<i>T. canis</i>	YY1 (5'-CGGTGAGCTATGCTGGTGTG-3') NC2 (5'-TTAGTTCTTTTCTCCGCT-3')	~330 bp	ITS-2	Li et al. 2007
<i>T. cati</i>	JW4 (5'-ACTGTCGAGGATGAGCGTGA-3') NC2 (5'-TTAGTTCTTTTCTCCGCT-3')	~660 bp	ITS-2	Li et al. 2007

Results

Toxocara spp. eggs were detected in five of 25 (20.0%) children's playgrounds. *Toxocara* spp. eggs were found in three (15.0%) of 20 children's playgrounds located in the city center and in two

(40.0%) of five children's playgrounds located in the recreation areas. *Toxocara* spp. eggs were detected in three of 60 sand samples (5.0%) collected from the city center and in two of 24 sand samples (8.3%) collected from recreation areas (Table 2).

Table 2. Distribution of helminths eggs detected in the sand and stool samples.

Samples	Number of Samples	Number of Positive Samples	<i>T. canis</i> *	<i>T. cati</i> *	<i>T. leonina</i>	<i>Capillaria</i> spp.	<i>Acanthocephala</i>
Sand samples from the city center	60	3	1	2	-	-	-
Sand samples from the recreation areas	24	2	1	1	-	-	-
Dog stool samples	21	1	-	-	1	-	-
Red fox stool samples	28	13	9	-	2	1	3
Cat stool samples	19	-	-	-	-	-	-

* Species identification of *T. canis* and *T. cati* eggs were performed with PCR.

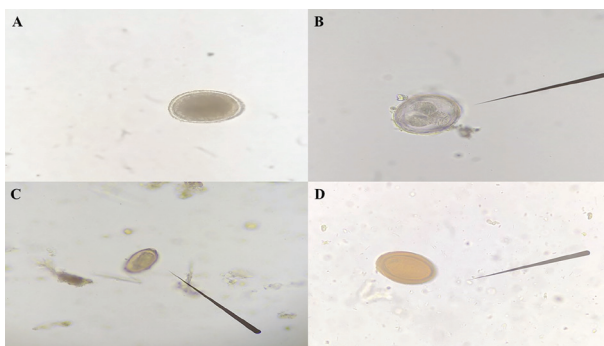


Figure 1. The eggs identified in the present study. A. *Toxocara* spp. eggs, B. *T. leonina* eggs, C. *Capillaria* spp. eggs, D. *Acanthocephala* eggs.

Toxocara spp. (9/28), *T. leonina* (2/28), *Capillaria* spp. (1/28), and *Acanthocephala* (3/28) eggs in fox stool samples; *Toxascaris leonina* in one dog's stool sample (Figure 1), and no helminths egg or larvae in the cat stool samples were detected during the microscopic examination.

The species-specific PCR assay revealed that *T. cati* was found in three sand samples (two from the city center and one from the recreation areas), whereas *T. canis* was detected in two sand samples (one from the city center and one from the recreation areas). Furthermore, according to the PCR results, all *Toxocara* spp. eggs obtained from nine different red foxes stool samples were identified as *T. canis* (Figure 2).

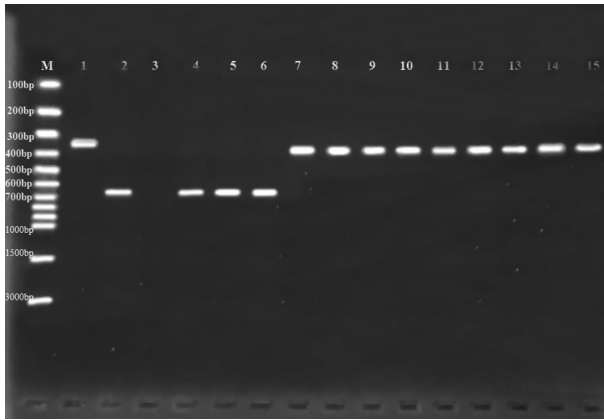


Figure 2. Agarose-gel electrophoresis of *Toxocara* spp. specific polymerase chain reaction. M. Marker, Lane 1. *T. canis* positive control DNA (~330 bp), Lane 2. *T. cati* positive control DNA (~660 bp), Lane 3. Negative control distilled water, Lane 4-6. *T. cati* positive DNA, Lane 7-15. *T. canis* positive DNA.

Discussion and Conclusion

Toxocariasis is a parasitic disease caused by the infective stage larvae of *T. canis* and *T. cati* in paratenic hosts such as humans. Humans get infected with *Toxocara* spp. after ingestion of embryonated eggs or infective stage larvae (Despommier 2003). After ingestion, larvae are released into the intestines of humans and do not develop to the adult stage. These infective stage larvae migrate to different internal organs and can cause visceral and ocular larvae migrants, covert toxocariasis, and neurotoxocarosis in humans (Overgaauw 1997; Despommier 2003). Definitive hosts such as dogs, cats, and wild carnivores can shed *Toxocara* spp. eggs via feces to the environment and cause severe contamination with *Toxocara* spp. in a short time. The reasons are as follows; i.) female adult parasites might produce up to 200,000 eggs in one day, ii.) these eggs develop within two weeks under optimal environmental conditions and reach the infective stage for paratenic (e.g. human and small rodent) or definitive hosts, iii.) *Toxocara* spp. eggs have a sticky and thick shell, these features protect eggs from harsh environmental conditions and remain infective for hosts for months (Overgaauw 1997; Despommier 2003; Overgaauw and van Knapen 2013; Traversa et al. 2014). For these reasons, human health is threatened by *T. canis* and *T. cati*, and eggs of these nematodes are mostly present in children's playgrounds (Overgaauw 1997; Despommier 2003). The aim of this research was to determine the presence and distribution of zoonotic helminths eggs in the chil-

dren's playgrounds in Sivas province using microscopic techniques and to identify *Toxocara* spp. to species level using PCR.

Human toxocariasis is more prevalent in children than adults (Overgaauw and van Knapen 2013). This situation could be related to that children are more exposed to *T. canis* and *T. cati* eggs while playing in children's playgrounds (Overgaauw 1997; Despommier 2003). Because the definitive hosts of these parasites can easily access public parks and children's playgrounds, these areas might be more contaminated with *Toxocara* spp. eggs than other areas (Sadowska et al. 2017). For this reason, many different studies have been conducted to determine the presence and distribution of *Toxocara* spp. egg in children's playgrounds (Avcioglu and Burgu 2008; Borecka and Gawor 2008; Nooraldeen 2015; Sadowska et al. 2017; Bystrianska et al. 2019; Aydin 2020). In a meta-analyses study, the global prevalence of *Toxocara* spp. was determined as 21%, while 16% in Turkey (Fakhri et al. 2018).

The flotation techniques have been used in many studies for the detection of *Toxocara* spp. eggs in sand samples. Because these techniques are cheaper and faster compared to molecular diagnostic methods like PCR (Oge and Oge 2000; Aydenizöz- Özkayhan 2006; Avcioglu and Balkaya 2011; Nooraldeen 2015; Bystrianska et al. 2019; Aydin 2020). However, flotation techniques are not eligible for the discrimination of *T. canis* and *T. cati* eggs since the eggs of these nematodes have similar morphologic features (Uga et al. 2000). Consequently, researchers have used species-specific PCR to recognize *T. canis* and *T. cati* eggs in contaminated materials (Borecka and Gawor 2008; Bozkurt et al. 2012; Durant et al. 2012). In this study, sand and stool samples were screened with both microscopic (flotation) and molecular (species-specific PCR) techniques.

In Turkey, many different studies were performed for the assessment of the presence of *Toxocara* spp. eggs in children's playgrounds using flotation (Güçlü and Aydenizöz 1998; Oge and Oge 2000; Toparlak et al. 2002; Aydenizöz-Özkayhan 2006) but there is only one study used PCR (Bozkurt et al. 2012). In these studies, *Toxocara* spp. eggs were found in children's playground in different prevalences such as 8.33% in Istanbul (Toparlak et al. 2002), 15.05-30.6% in Ankara (Oge and Oge 2000; Avcioglu and Burgu 2008), 15.60% in Kırıkkale (Aydenizöz-Özkayhan 2006), 18.91% in Aydın (Gürel et al. 2005), 4.16% in Konya (Güçlü and Aydenizöz 1998), 25.97% in Van (Ayaz et al. 2003), 10% in Kü-

tahya (Akdemir 2010), 14.01% in Erzurum (Avcioglu and Balkaya 2011), and 25.53% in Karaman (Aydın 2020), respectively. *Toxocara* spp. eggs were detected in 7.3% of the children's playgrounds in a study conducted with PCR in Kayseri (Bozkurt et al. 2012). With the current study, we detected *Toxocara* spp. eggs in 5.9% of sand samples (5/84). This result showed that our result was only higher than in Konya (Güçlü and Aydenizöz 1998) and lower than the other studies performed in Turkey. The prevalence of *Toxocara* spp. in sand samples may change according to the climatic conditions of sampling areas, numbers of companion animals (cats or dogs), and activities of the municipalities (Fakhri et al. 2018; Aydın 2020). *Toxocara* species need high temperatures (25-30°C) and humidity to complete their embryonic development in the environment (Anderson 2000). The average annual temperature of Sivas is +8.9°C. This low temperature in Sivas province may not be eligible for *Toxocara* spp. to complete their development. For this reason, a lower amount of *Toxocara* spp. eggs can reach the infective stage in Sivas compared to the other cities that have moderate climatic conditions. As a consequence of this, a lower amount of definitive host is exposed to the infective *Toxocara* eggs. It is also very important that children's playgrounds are surrounded with fences by municipalities since it will be more difficult for the definitive hosts of *T. canis* and *T. cati* to enter the fenced parks and these playgrounds (Avcioglu and Balkaya 2011). In Sivas province, most of the children's playgrounds are fenced. We speculate that thanks to the harsh climatic conditions of Sivas province and fenced children's playgrounds, *Toxocara* spp. was found in low prevalence in sand samples in our study.

In the current study, a species-specific PCR assay was used for the discrimination of *Toxocara* spp. eggs obtained from sand and stool samples. For the identification of *Toxocara* spp. eggs with PCR, the ITS-2 gene has been used by researchers. This gene can be successfully used in the recognition of *Toxocara* species such as *T. canis*, *T. cati*, *T. vitulorum*, and *T. malaysiensis* (Li et al. 2007; Borecka and Gawor 2008; Bozkurt et al. 2012; Durant et al. 2012). For this reason, we used the ITS-2 gene in this study. According to the PCR results in the present study, *T. cati* was found in three sand samples, whereas *T. canis* was detected in two sand samples. Furthermore, *T. canis* was found in nine red fox stool samples. PCR results revealed that red fox is responsible for the contamination of children's playgrounds with *Toxocara* eggs.

The red fox is the most widespread wild mammal in Turkey (Ambarlı et al. 2016). This animal is known to be the definitive host of *T. canis* in the sylvatic cycle (Taylor et al. 2016). For this reason, the red fox plays an important role in the contamination of the environment with *T. canis* eggs. In the current study, the rate of *T. canis* eggs was found at 32.1% (9/28) with PCR assay in red fox stool samples. Moreover, *T. leonina* (2/28), *Capillaria* spp. (1/28), and *Acanthocephala* (3/28) eggs were detected in red fox stool samples. This study revealed that red fox is also responsible for environmental contamination with zoonotic helminth eggs. Therefore, authorities should take precautions to prevent access of red foxes to children's playgrounds to protect human health.

In conclusion, this is the first survey of *Toxocara* spp. in play gardens from Sivas. As a result of this study, both *T. canis* and *T. cati* eggs were detected in sand samples. These results revealed that children playing in contaminated play gardens could be at risk in terms of human toxocariasis. Human toxocariasis is one of the most dangerous parasitic diseases in Turkey. This dangerous disease can also be preventable with the precautions like eliminating infection in definitive hosts using anthelmintic drugs, educating pet owners, and preventing access of definitive hosts to children's playgrounds.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflicts.

Acknowledgment: This work is supported by the Scientific Research Project Fund of Sivas Cumhuriyet University under the project number V-107.

Ethical Statement: This study does not present any ethical concerns.

References

- Akdemir C. (2010) Visceral larva migrans among children in Kütahya (Turkey) and an evolution of playgrounds for *T. canis* eggs. *Turk J Pediatr.* 52, 158-162.
- Ambarlı H, Ertürk A, Soyumert A. (2016) Current status, distribution, and conservation of brown bear (Ursidae) and wild canids (gray wolf, golden jackal, and red fox; Canidae) in Turkey. *Turk J Zool.* 40, 944-956.
- Anderson RC. (2000) *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. Second edition. Cabi Publishing, London.
- Avcioglu H, Burgu A. (2008) Seasonal prevalence of *Toxocara* ova in soil samples from public parks in Ankara, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 345-350.
- Avcioglu H, Balkaya I. (2011) The relationship of public park accessibility to dogs to the presence of *Toxocara* species ova in the soil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 177-180.

- Ayaz E, Yaman M, Gül A. (2003) Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in soil of public parks in Van, Turkey. *Indian Vet J.* 80, 574-576.
- Aydenizöz-Özkayhan M. (2006) Soil contamination with ascarid eggs in playgrounds in Kirikkale, Turkey. *J Helminthol.* 80, 15-18.
- Aydın MF. (2020) Presence of *Toxocara* spp. and other zoonotic parasites Ova in children's playground in Karaman, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg.* 44, 17-20.
- Borecka A, Gawor J. (2008) Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *J Helminthol.* 82, 119-122.
- Bozkurt Ö, Yildirim A, İnci A. (2012) Kayseri ili parklarında bulunan oyun alanlarının Askarit türleri ile kontaminasyonunun parazitolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 18, A175-180.
- Bystrianska J, Papajová I, Šoltys J, Sasáková N. (2019) Contamination of sandpits with soil-transmitted helminth eggs in an urban environment. *Folia Vet.* 63, 60-63.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020) Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/parasites/toxocarosis/>, Erişim tarihi: 24.08.2021.
- Despommier D. (2003) Toxocarosis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev.* 16, 265-272.
- Dinkel A, von Nickisch-Roseneck M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. (1998) Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J Clin Microbiol.* 36, 1871-1876.
- Durant JF, Ireng LM, Fogt-Wyrwas R, Dumont C, Doucet JP, Mignon B, Losson B, Gala JL. (2012) Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasit Vectors.* 5, 1-9.
- Fakhri Y, Gasser RB, Rostami A, Fan CK, Ghasemi SM, Javanian M, Bayani M, Armoon B, Moradi B. (2018) *Toxocara* eggs in public places worldwide-A systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut.* 242, 1467-1475.
- Güçlü F, Aydenizöz M. (1998) Çocuk parklarındaki kumların köpek ve kedi helminti yumurtaları ile kontaminasyonunun tesbiti. *Türkiye Parazitol Derg.* 23, 24-27.
- Gürel FS, Ertuğ S, Okyay P. (2005) Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in public parks of the city of Aydın, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg.* 29, 177-179.
- Hofer S, Gloor S, Müller U, Mathis A, Hegglin D, Deplazes P. (2000) High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zürich, Switzerland. *Parasitology.* 120, 135-142.
- Kazacos KR. (1983) Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. *Am J Vet Res.* 44, 896-900.
- Kleine A, Springer A, Strube C. (2017) Seasonal variation in the prevalence of *Toxocara* eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. *Parasit Vectors.* 10, 1-8.
- Li MW, Lin RQ, Chen HH. (2007) PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes.* 21, 349-354.
- Nooraldeen K. (2015) Contamination of public squares and parks with parasites in Erbil city, Iraq. *Ann Agric Environ Med.* 22, 418-420.
- Oge S, Oge H. (2000) Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in the soil of public parks in Ankara, Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 107, 72-75.
- Overgaauw PAM. (1997) Aspects of *Toxocara* epidemiology: human Toxocarosis. *Crit Rev Microbiol.* 23, 215-231.
- Overgaauw PA, van Knapen F. (2013) Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 193, 398-403.
- Robertson ID, Thompson RC. (2002) Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes Infect.* 4, 867-873.
- Sadowska N, Tomza-Marciniak A, Juszczyk M. (2019) Soil contamination with geohelminths in children's play areas in Szczecin, Poland. *Ann Parasitol.* 65, 65-70.
- Smith H, Noordin R. (2006) Diagnostic Limitations and Future Trends in Serodiagnosis of Human Toxocarosis. Holland CV, Smith HV. eds. *Toxocara the enigmatic parasite*, CABI Publishing, Cambridge. p.89-112.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. (2016) *Veterinary Parasitology*, Fourth edition. Blackwell Publishing, Oxford.
- Toparlak M, Gargili A, Tüzer E, Keleş V, Esatgil MU, Çetinkaya H. (2002) Contamination of children's playground sandpits with *Toxocara* eggs in İstanbul, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 26, 317-320.
- Traversa D, di Regalbono AF, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobelli M. (2014) Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasit Vectors.* 7, 1-9.
- Uga S, Matsuo J, Kimura D, Rai SK, Koshino Y, Igarashi K. (2000) Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Vet Parasitol.* 2000, 92, 287-294.
- Zajac AM, Conboy GA, Greiner EC, Smith SA, Snowden KF. (2012) Fecal Examination for the Diagnosis of Parasitism. Zajac AM, Conboy GA. eds. in *Veterinary Clinical Parasitology*, Eighth edition. John Wiley and Sons, Sussex. p.3-171.



Temporal and spatial distribution of bovine tuberculosis outbreaks in Turkey (2005-2020)

Şahin Çakır¹, Mustafa Yakar², Fevziye İpek Keskin³

¹ Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies, Department of Animal Health, Food and Feed Research, Ankara, Turkey.

² Süleyman Demirel University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Geography, Isparta, Turkey.

³ Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Food and Control, Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 17.09.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 15.11.2021

Abstract: This research aims to reveal the temporal changes and spatial patterns of Bovine Tuberculosis (bTB) in Turkey in the last 16 years using OIE and MoAF data. Considering the zoonotic character and socio-economic impact of the disease, the rapid increase in the number of bTB outbreaks has reached alarming levels recently. As a matter of fact, around 20-fold increase in the number of outbreaks between 2005 and 2020 clearly shows this. In the same period, the compensation payment of approximately 611 million new TL (₺) for 168,244 cattle that were conditionally slaughtered and died due to illness reveals the economic impact of the disease. Also, it is known that human cases are caused by *M. bovis*, although at a low rate (5.3%). In parallel with the increase in the number of bTB outbreaks, it has spread throughout the country (except for some provinces) geographically. It is important to fight bTB disease effectively, to reduce the risks to public health and the socio-economic losses caused by the disease. For this reason, it is extremely important to monitor the temporal course of the disease outbreaks epidemiologically and to reveal their spatial patterns at various scales. For an effective fight against bTB, it is vital to monitor, analyze, and put into practice the temporal changes and spatial distribution dynamics of all the variables (especially animal movements) of the transmission dynamics in the epidemiology of the disease.

Keywords: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, spatial distribution, temporal distribution, zoonosis

Türkiye’de sığır tüberkülozu mihraklarının zamansal ve mekânsal dağılımı (2005-2020)

Özet: Bu araştırma, OIE ve Tarım ve Orman Bakanlığı verileri kullanılarak Sığır Tüberkülozu (bTB)’nun Türkiye’de son 16 yıldaki zamansal değişimi ile mekânsal örüntülerini ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır. Hastalığın zoonotik karakteri ve sosyo-ekonomik etkisi düşünüldüğünde son zamanlarda bTB mihrak sayılarının hızlı artışı kaygı verici düzeylere erişmiştir. Nitekim 2005-2020 yılları arasında mihrak sayılarının yaklaşık 20 kat artışı bunu açıkça göstermektedir. Aynı dönemde hastalık nedeniyle şarta tabi kesilen ve ölen 168.244 büyükbaş hayvan için yaklaşık 611 milyon yeni TL (₺) tazminat ödemesi hastalığın ekonomik etkisini ortaya koymaktadır. Ayrıca, insan vakalarının düşük bir oranda (%5,3) olsa da *M. bovis* kaynaklı olduğu bilinmektedir. bTB mihrak sayılarının artışına paralel bir şekilde hastalık coğrafik olarak ülke geneline (bazı iller dışında) yayılmıştır. bTB hastalığıyla etkin mücadele edilebilmesi, halk sağlığına yönelik risklerin ve hastalığın neden olduğu sosyo-ekonomik kayıpların azaltılması önemlidir. Bu nedenle epidemiyolojik olarak hastalık mihraklarının zamansal seyirinin izlenmesi ve çeşitli ölçeklerde mekânsal örüntülerini ortaya çıkarmak son derece önem arz etmektedir. bTB ile etkin bir mücadele için, hastalığın epidemiyolojisindeki buluşma dinamiklerine ait tüm değişkenlerin (özellikle hayvan hareketleri) zamansal değişimi ve mekânsal dağılım dinamiklerinin izlenmesi, analiz edilmesi ve uygulamaya geçirilmesi hayati önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Mekânsal dağılım, *Mycobacterium bovis*, sığır tüberkülozu, zamansal dağılım, zoonoz

Introduction

Bovine Tuberculosis (bTB) is an infectious disease of cattle caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). It has a zoonotic character and a wide host range that can infect wildlife, causes remarkable economic losses such as yield losses, expenditures for the control of the disease, and international trade restrictions (Orloski et al. 2018; Raphaka et al. 2018; Mekonnen

et al. 2019). bTB is a major cause of economic loss to livestock owners worldwide with an estimated over 50 million infected cattle and an annual cost of \$3 billion (Waters et al. 2012). The disease causes zoonotic tuberculosis in humans, especially as a result of unpasteurized milk consumption or living with infected animals. For the control and eradication of

the disease, the test and slaughter method is applied by most countries (Buddle et al. 2018).

bTB is a chronic disease that has an endemic course in cattle herds in Turkey (Viviani et al. 2016). In a study conducted in different provinces with the Tuberculin Skin Test (TST) in 2000 to determine the prevalence of bTB, a positivity rate of 9.9% was found (Doğan 2011). Finally, in a national study conducted in 2011, the individual cattle prevalence was reported as 1.4% and the herd prevalence was approximately 2.5% with a comparative intradermal tuberculin test in 2011 (Bartels et al. 2012). The socio-economic impact of bTB on public health and the agricultural sector in Turkey is estimated to be between \$15 and \$59 million annually (Cousins 2001). According to the data of the Ministry of Agriculture and Forestry (MoAF), while 59 bTB outbreaks were reported in Turkey in 2001, the number of outbreaks showed an increasing trend in the following years and reached the highest level in the country's history with 2,248 bTB outbreaks in 2019 (Doğan 2011). This 38-fold increase in the number of bTB outbreaks will also be reflected an increase in public health risk and socio-economic loss. bTB should also be monitored because of being a zoonotic disease. As a matter of fact, according to the data of the Ministry of Health, the number of Tuberculosis patients in Turkey was reported as 11,821 in 2017 (Kara et al. 2020). When the strains isolated from these patients were evaluated, it was reported that 5.3% of them were caused by *M. bovis* (Bayraktar et al. 2011).

With this study, it was aimed to monitor the temporal course of bTB outbreaks in Turkey and to determine their spread with spatial patterns according to the World Animal Health Organization, Animal Health Information System (OIE, WAHIS), and MoAF data. Changes in temporal increase trends and spatial patterns of bTB outbreaks can provide meaningful information in terms of determining strategies in combating the disease.

Material and Method

In this descriptive study, the data on bTB outbreaks of Turkey in annual animal health reports from OIE, WAHIS between 2005 and 2020, and the number of animals and compensation paid for the same period due to bTB disease obtained from the General Directorate of Food and Control (GDFC) of MoAF were used. These reports were transferred to Microsoft office programs and epidemiological analyzes of

the temporal course and spatial diffusion patterns of bTB outbreaks by years, provinces, and months were done retrospectively. In addition, the literature was searched and the information about the number of outbreaks of previous years and the studies carried out in the fight against the disease were included in our research.

Since the subject of this research is a notifiable disease, necessary legal permissions have been obtained from MoAF to provide the data and publish the results.

Results

Temporal changes of bovine tuberculosis outbreaks (2005-2020)

According to the veterinary statistics published by the MoAF on the notifiable animal diseases, 31 bTB outbreaks between 1976-1978 and 45 bTB outbreaks between 1980-1985 were reported (Doğan 2011). In 1985, the "Turkey Tuberculosis Struggle Project" was prepared. Turkey was divided into five regions, starting from the 1st region, 20% of the animal population in the first year and 40% in the second and third years were included in the scope of the struggle. Within the scope of the project, it was aimed to carry out the struggle in 67 provinces, 639 districts, and 36,610 villages and to apply TST to a total of 5,851,000 animals. TST was applied to 249,387 cattle in 1986, and a total of 1,983 (0.79%) cattle were found to be bTB positive in 153 outbreaks. TST was applied to 63,920 cattle in 1987 and a total of 252 (0.39%) cattle were found to be bTB positive in 96 outbreaks. TST was applied to 117,500 cattle between 1988 and 1995, and a total of 1,474 (1.25%) cattle were determined to be bTB positive in 263 outbreaks. Although we do not have data for 1996 and 1997, when the average between 1996 and 2004 is evaluated, it is understood that TST was applied to approximately 40,000 cattle and bTB outbreaks between 470-500 was observed (Sayın 2010; Doğan 2011). According to these data, it can be said that between 1976 and 2004, approximately 1,050-1,100 bTB outbreaks were detected in Turkey. In a study carried out by the Veterinary Control Central Research Directorate in 2000 to determine the prevalence of bTB in Turkey as an indicator between these years, positivity was found in 522 (9.9%) animals that were administered TST to 5,257 animals from different (Doğan 2011).

According to OIE-WAHIS data, the number of bTB outbreaks in Turkey between 2005 and 2020 can

be categorized as 1st period (2005-2010), 2nd period (2010-2016), and 3rd period (2016 and after) as seen in Figure 1. In these three periods, first there was an increase and then a decrease as a general trend. This course shows us that the slaughter of reactor animals as a result of the combat efforts is reflected in the decrease of the outbreaks numbers in the following years. The number of outbreaks in 2012

exceeded an important threshold by triple the number of outbreaks of the previous year. With 2,248 outbreaks in 2019, the annual number of bTB outbreaks reached the highest known level in the history of our country. Between 2005 and 2020, there was an approximately 20-fold increase in the number of bTB outbreaks.

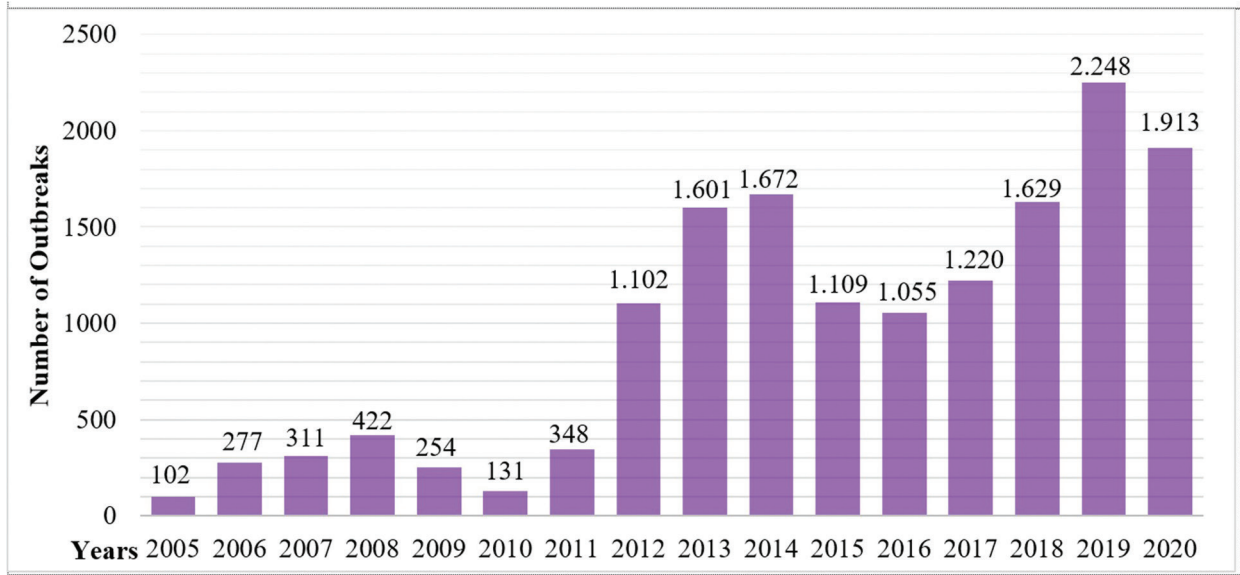


Figure 1. Distribution of bTB outbreak numbers in Turkey (2005-2020) (OIE-WAHIS)

Distribution of bovine tuberculosis outbreaks by months (2005-2020)

Epidemiological processes of infectious diseases need to be monitored at different temporal scales. In this context, the purpose of examining the distribution of bTB outbreaks based on the current data in Turkey according to the months in the year, apart from the annual course is to consider latent course of the disease, animal movements between the premises during the year, the animals being in the barns or pasture, sacrificial slaughter, the time of compensation payment, the increase or decrease in the slaughters due to the change in meat consumption during the year, which may be effective in the reporting of bTB suspected cases. All these predicted factors require monitoring and examining not only the annual but also the monthly course of the disease outbreak numbers.

The general increase in the monthly course of bTB outbreaks between 2005 and 2020 is shown in Figures 2-3. When the distribution of the outbreaks by months is carefully examined, it is notable that

there is a significant increase of outbreak numbers in September 2016-2017, and in August 2018-2019-2020, although there is no obvious seasonality. This increasing trend in the monthly distribution and the monthly shift towards the previous month over the years should be related to the fact that the Feast of Sacrifice coincides with these months in the mentioned years. As a reflection of the increasing prevalence of the disease, the possibility of macroscopic lesions in sacrificial cattle has also increased. It is considered that there is an increase in the number of outbreaks due to the notifications made as a result of the presence of disease lesions during sacrificial slaughter. This situation gives the impression that within the scope of the relevant compensation regulations, 3/4 of the value of their carcasses will be compensated for the cattle slaughtered in slaughterhouses or designated sacrificial slaughtering places during the Feast of Sacrifice, and based on these notifications the disease is diagnosed as a result of TST applied in the origin premises.

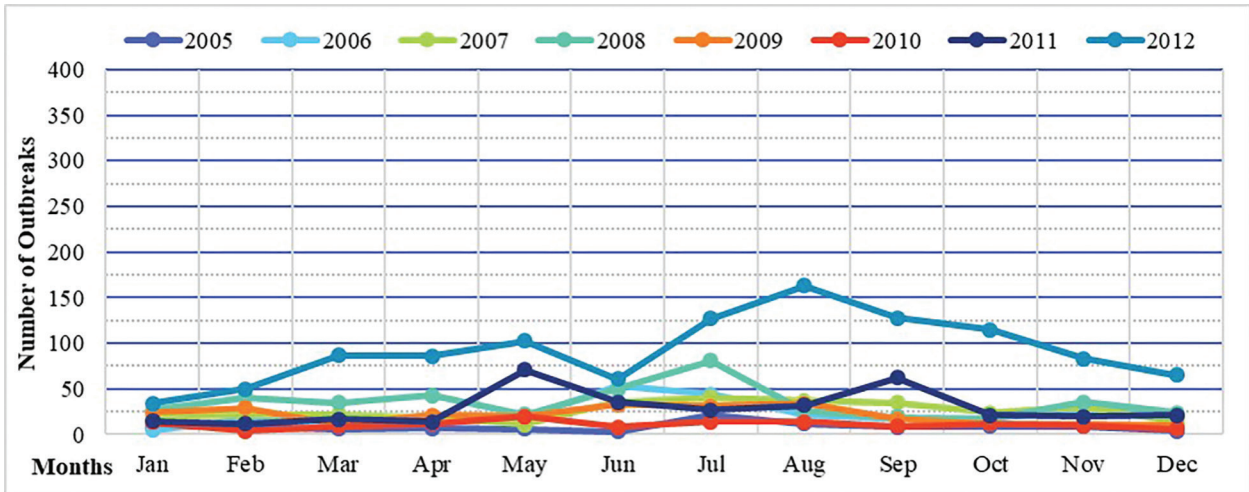


Figure 2. Monthly distribution of bTB outbreaks in Turkey (2005-2012) (OIE-WAHIS)

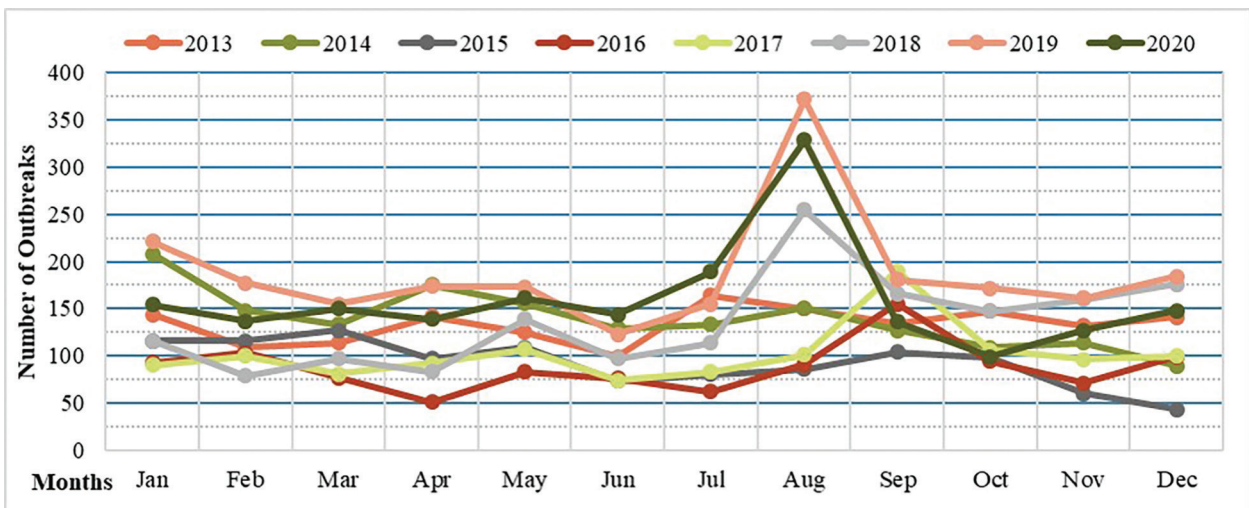


Figure 3. Monthly distribution of bTB outbreaks in Turkey (2013-2020) (OIE-WAHIS)

Temporal changes of the number of animals compensated and the amount of compensation paid (2005-2020)

The provisions regarding the culling and compensation of the bTB (tederrün-The Ottoman Turkish name of bTB in Legislations) were included for the first time in the Law named "Zâbıta-i Sıhhiye-i Hayvâniye Kânun-i Muvakkatı" adopted on 18 December 1913 to combat animal diseases. In this Law, it is stipulated that in case of culling of animals with positive results in tuberculin application, 1/2 of the value of the animal, and in case of culling of suspicious animals, 2/3 of the price will be paid as compensation (Doğan 2011). After various adjustments were made in the legislation in the intervening pe-

riod, compensation is paid according to the provisions of the "Veterinary Services Plant Health Food and Feed Law" numbered 5996 published in the Official Gazette on 13 June 2010 and the compensation regulations published within the scope of this Law. Accordingly, compensation is paid at the rate of 9/10 of their appreciated value for cattle determined with TST or killed or slaughtered during the quarantine period, and 3/4 of their carcass value for cattle detected as bTB as a result of slaughter in the slaughterhouse or in the sacrificial slaughter places.

The general sum of the loss aimed to be prevented by the project planned to combat bTB in 1985 was calculated as 201,162,537,000 TL, according to the former TL. In 1986 which was the first year of

the project 211,973,852 TL compensation was paid for 1,983 cattle. However, financial problems were encountered in the following years and 50,177,282 TL compensation was able to be paid for 252 cattle in 1987. Between 2000 and 2004, a compensation of 1,109,948,472 TL was paid for 1,361 cattle, according to the total former TL (Doğan 2011).

Between 2005 and 2020, a compensation of 610,907,224 ₺ was paid for 168,244 cattle according to the new TL (₺). The number of compensated animals and the amount of compensation paid in this period are shown in Figure 4. In parallel with the periodic increase or decrease in the number of bTB outbreaks, an increase or decrease is observed in the number of animals for which compensation is paid and the amount of compensation paid. It is

seen that the deductions made according to the age, gender, general valuation of the animals for which compensation is paid; the price of roasting paid, and the increase in the animal prices are also reflected in the amount of compensation. For instance, although the numbers of animals that were conditionally slaughtered or died due to bTB positivity in 2013 and 2019 were similar, according to the data of the Turkish Statistical Institute, there was an about two-fold increase in the amount of compensation paid due to the increase in livestock prices between these years. In addition, starting the deduction of the depreciation value of these animals over the value of them in accordance with the legislation in these years was reflected as a decrease in the amount of paid compensation.

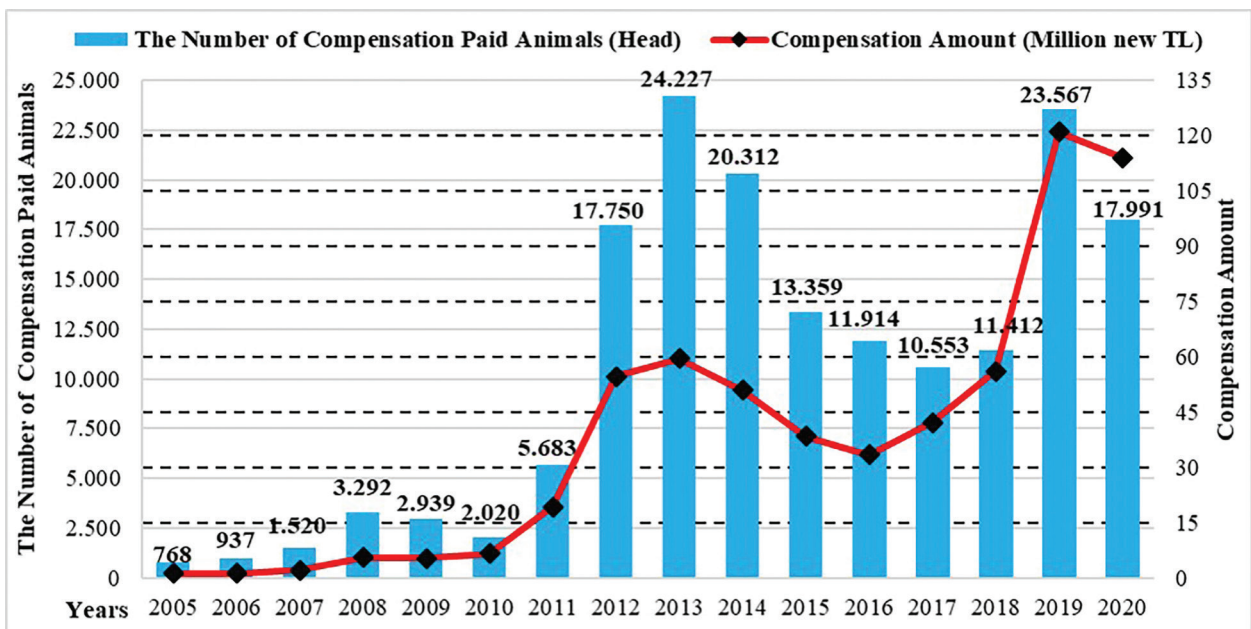


Figure 4. The number of animals for which compensation was paid due to bTB disease in Turkey and the amount of compensation (2005-2020) (MoAF) (\$1=Approximately 9.5 new Turkish Lira)

Spatial distribution of bovine tuberculosis outbreaks by provinces (2005-2020)

In addition to the general course of bTB disease in the country, its spatial distribution should also be monitored. At least 45.1% of bTB disease outbreaks are in other premises in the same settlement and its spread shows spatially different patterns (Çakır 2021). In this study, the data obtained from the OIE-WAHIS database and organized according

to the provinces were mapped separately per years, and the total numbers between 2005 and 2020 were mapped thematically (choropleth). When the maps are examined, it is understood that bTB disease has spread over time to all provinces in Turkey, except for some provinces of the Eastern Black Sea, Eastern and Southeastern Anatolia regions (Figures 5-9).

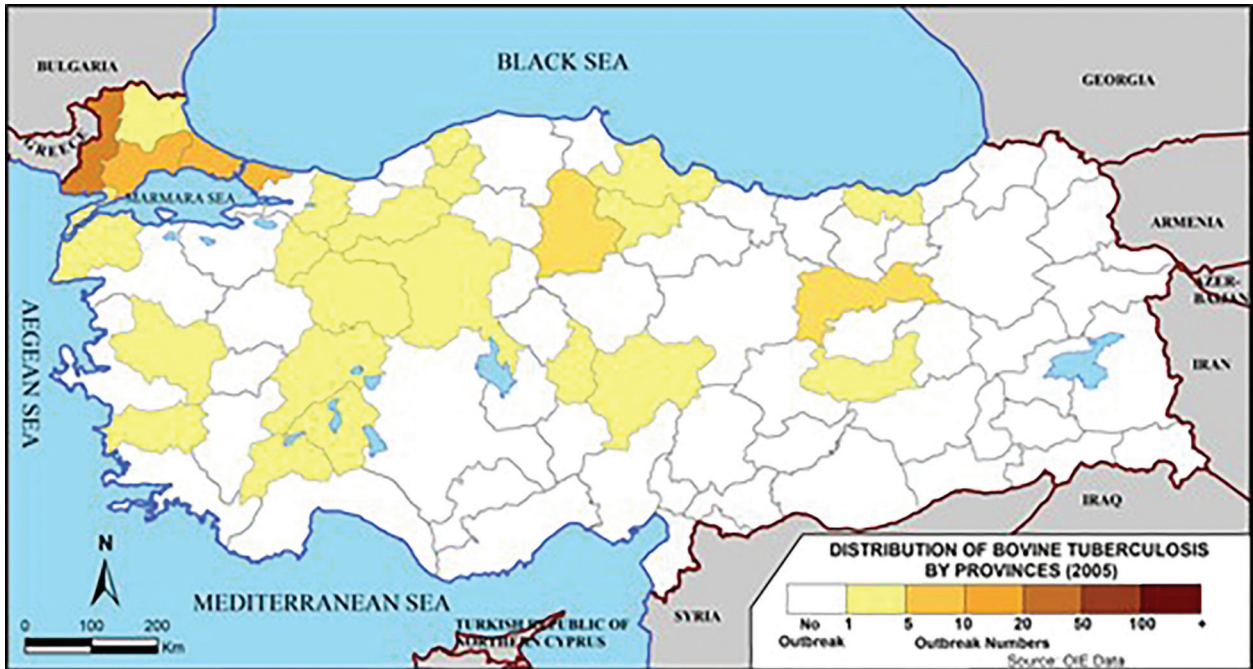


Figure 5. Distribution of bTB outbreaks by provinces in Turkey (2005) (OIE-WAHIS)

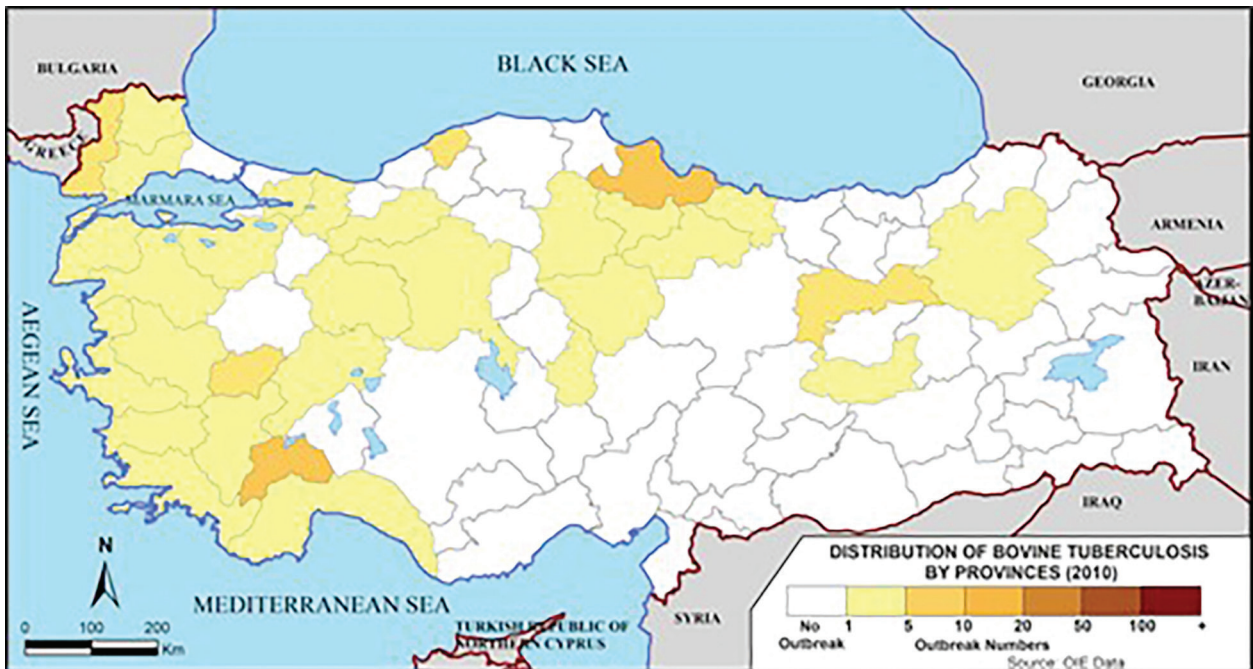


Figure 6. Distribution of bTB outbreaks by provinces in Turkey (2010) (OIE-WAHIS)

The fact that the disease is less common in the Eastern Black Sea region may be related to the geographical structure of the region and the small scale and scattered premises. In some provinces in the Eastern and Southeastern Anatolia regions, it can be thought that the disease notifications may not have

been made sufficiently. In the provinces with a high outbreak density, it has been considered that post-mortem inspection is carried out effectively in slaughterhouses and the disease notification is made carefully as a result of the application of TST to the animals in the suspicious premises by providing the

feedback of the detected cases. The change in the distribution of both the annual and the total number of outbreaks between 2005 and 2020 by provinces is remarkable. For sure, it is necessary to focus

on the change in the size of the total number of cattle in the provinces and the differentiation of the premise typology.

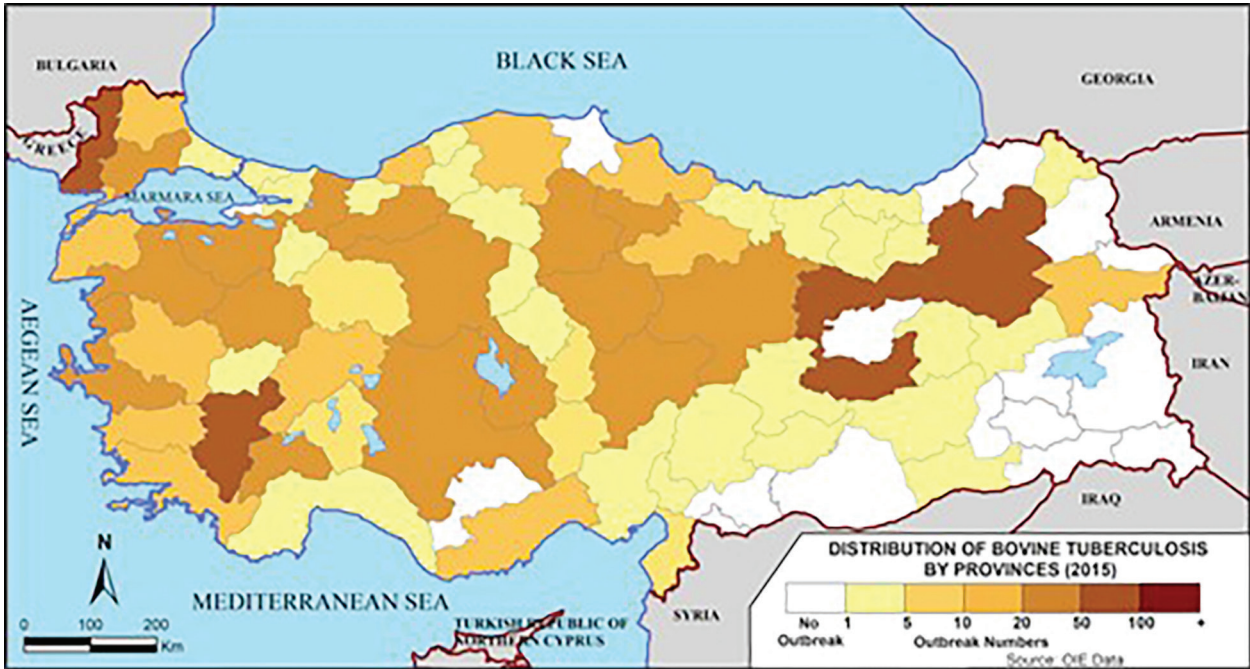


Figure 7. Distribution of bTB outbreaks by provinces in Turkey (2015) (OIE-WAHIS)

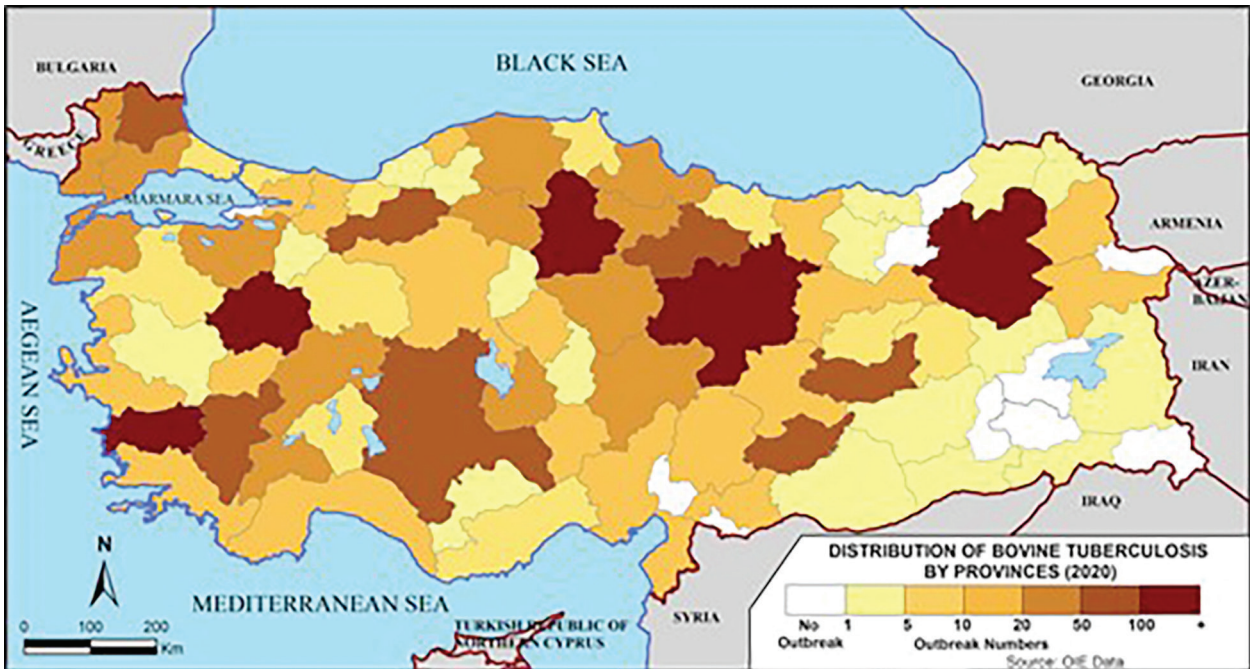


Figure 8. Distribution of bTB outbreaks by provinces in Turkey (2020) (OIE-WAHIS)

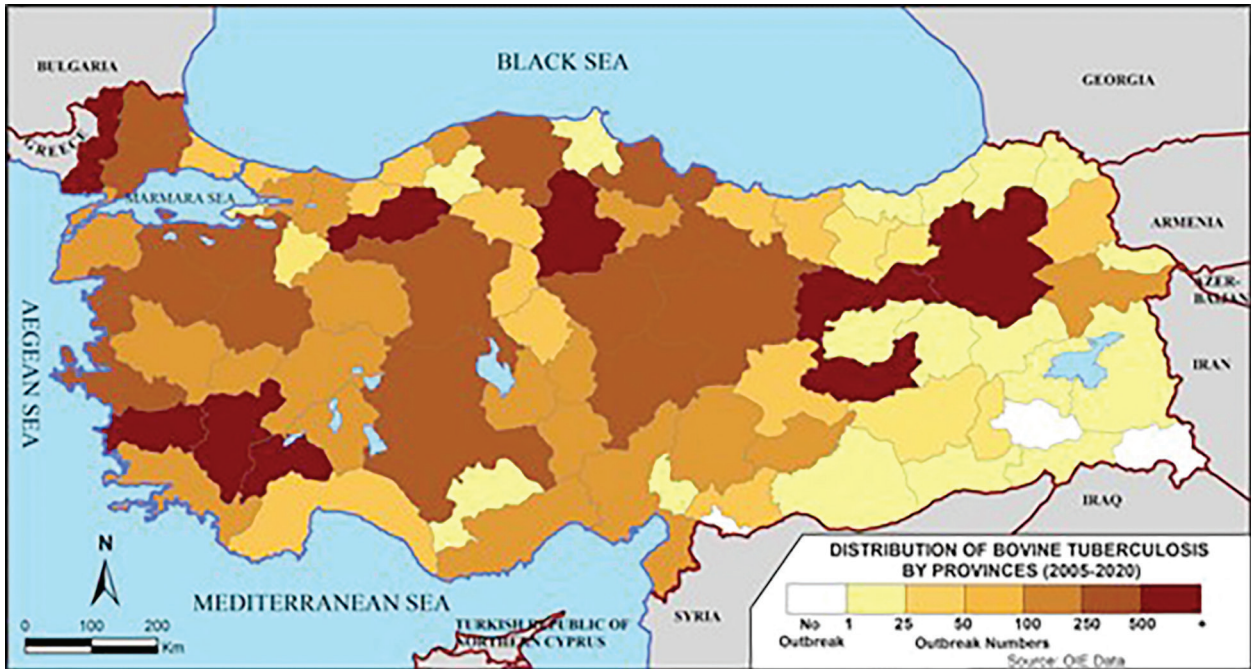


Figure 9. Total distribution of bTB outbreaks by provinces in Turkey (2005-2020) (OIE-WAHIS)

The first 10 provinces with the highest number of bTB outbreaks in total between 2005 and 2020 and the number of outbreaks are shown in Figure 10. It is seen that provinces such as Denizli, Erzincan, Erzurum, and Aydın always have more outbreaks. It

can be said that the disease has spread more in these provinces or an effective struggle is carried out within the scope of combating the disease compared to other provinces.

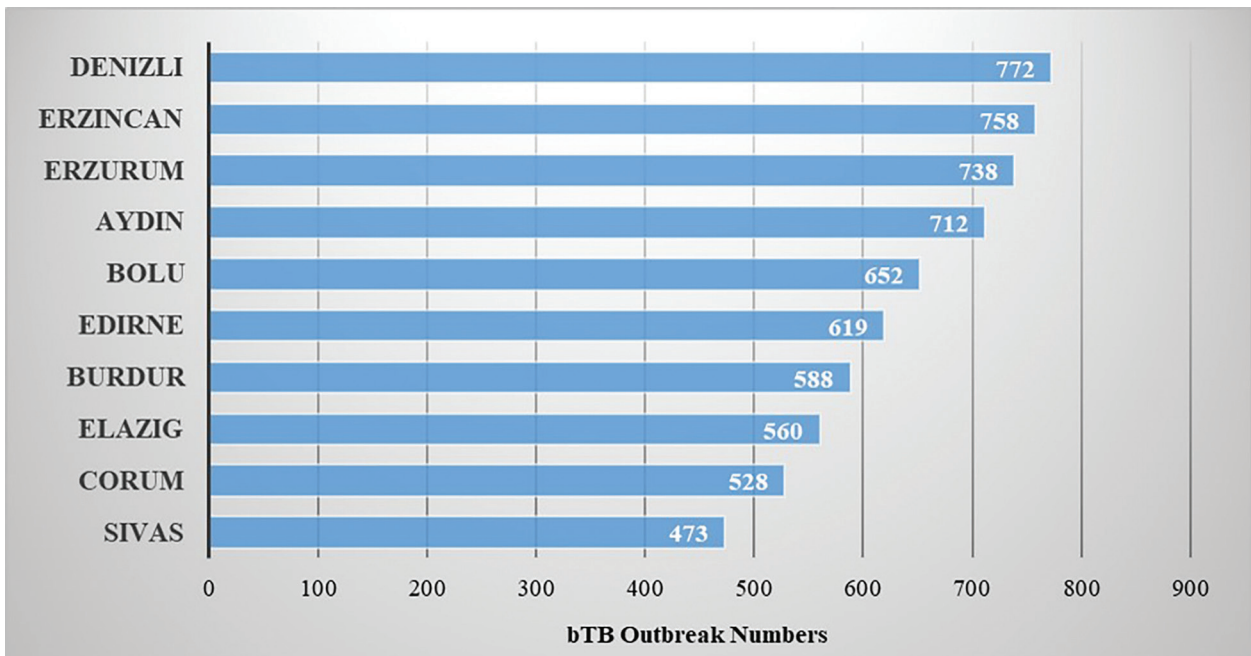


Figure 10. Ten provinces with the most bTB outbreaks in Turkey and the number of outbreaks (2005-2020) (OIE-WAHIS)

The spatial aspects and frequencies of animal movements also determine the spatial distribution patterns of the disease. Several factors can be mentioned in the emergence of different patterns of spatial distribution. The spatial distribution patterns of these factors according to the provinces can also be mapped and associated with the spread of the disease. Apart from this, knowing and monitoring spatial patterns in the fight against the disease will be useful for the development of control strategies. The spatial scale of the data on the epidemiology of the disease and the dynamics affecting it also needs to be carefully considered. Mapping can also be done according to regions, provinces, districts, villages, and even premises. When we change the spatial scale of the map, the emerging patterns will differ and the priority areas of intervention will be clearly defined. Quarantine measures to be applied to these areas when necessary are of vital importance in preventing the spread (diffusion) of the disease. Here, the spatial perspective will make a meaningful contribution with all these aspects of the course of the disease and the results it will reveal.

Discussion and Conclusion

bTB disease in cattle has inherent difficulties such as its latent course, easy transmission, lacking sensitivity and specificity of diagnostic tests, the fact that an effective vaccine that provides enough immunity and does not interfere with diagnostic tests has not been developed so far, and its struggle is long-term. In addition to all these, the existence of causes such as Turkey's unique family-type premise structure, insufficient control of animal movements, animal markets, dealers, pasture livestock, social projects, economic situation, etc. accelerates the spread of bTB disease among premises. The total number of bTB outbreaks between 1976 and 2004 started to occur annually after 2012. In 2012, it tripled the number of the previous year and exceeded an important threshold. Between 2005 and 2020, the number of outbreaks increased approximately 20 times and reached the highest value in the country's history in 2019.

The increase in the number of bTB outbreaks in Turkey, especially in recent years, makes it difficult to fight against the disease effectively. At the same time, it causes an increase in risks to public health and an increase in multi-drug resistant *M. bovis* strains in the treatment process of humans. The incidence of the disease is also increasing in humans whose immune system is suppressed (HIV+).

The fight against the disease brings a serious socio-economic burden to the country in the long

term. It is extremely important that it causes an increase in socio-economic losses such as yield and breeding animal losses, struggle costs, paid compensations, treatment costs of humans, trade restrictions due to the disease.

It is seen that the payment of compensation due to the detection of bTB lesions in animals slaughtered in slaughterhouses and designated sacrificial slaughtering places during the Feast of Sacrifice is reflected in the disease notification figures. As a result of the questionnaire study we conducted within the scope of the national project, it was seen that the failure to pay the compensations on time negatively affected the decision of 24% of the breeders (Çakır 2021). To fight the disease effectively, it is important that compensation payments are paid on time, without any deductions, and by providing a sustainable source of finance. Otherwise, breeders and slaughterhouses do not act sensitively in the notification of the disease, causing the disease to spread more and putting public health at more risk. Since there has not been any research on the epidemiology of bTB in Turkey until today, no comparison has been made on a national scale. To conduct a more detailed epidemiological study on the dynamics of bTB infection, the direction and magnitude of animal movements and the Geographic Information System coordinate data of premises with bTB outbreaks are needed. Apart from this, the possibility of transmission with wildlife contact should be considered.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment: A part of this study is based on the doctoral thesis "Developing an epidemiological model based on the infection dynamics of Bovine Tuberculosis" at Kırıkkale University Health Sciences Institute. We thank the Veterinary Control Central Research Institute personnel for their contribution to the project. This study was supported as a national project (TAGEM/HSGYAD/Ü/20/A5/ P1/1643) by MoAF, General Directorate of Agricultural Research and Policies.

Ethical Statement: Ethics committee approval is not required for this study.

References

- Bartels C, Bergevoet R, Emmerzaal A, Emmerzaal A, De Gee T, Schrijver R, Van Zijderveld F. (2012) Türkiye'de bruselloz ve tüberkülozun eradikasyonu. Central Veterinary Institute, Wageningen, Netherlands.
- Bayraktar B, Bulut E, Barış AB, Toksoy B, Dalgıç N, Çelikan C, Sevgi D. (2011) Species distribution of the *Mycobacterium*

- tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: A prospective study. *J Clin Microbiol.* 49, 3837-3841. doi:10.1128/JCM.01172-11
- Buddle BM, Vordermeier HM, Chambers MA, de Klerk-Lorist L-M (2018) Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. *Front Vet Sci.* 5, 259. doi: 10.3389/fvets. 2018.00259
- Cousins DV. (2001) *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.* 20, 71-85.
- Çakır Ş. (2021) Sığır tüberkülozunun enfeksiyon dinamiklerine dayalı epidemiyolojik model geliştirme. Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- Doğan Ö. (2011) Türkiye’de sığır tüberkülozunun kontrolü ve eradikasyonuna yönelik çalışmaların tarihi. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Kara F, Kabasakal E, Yıldırım A, Mutlu MS, Baykal F. (2020) Türkiye’de Verem Savaşı 2019 Raporu. Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- Mekonnen GA, Conlan AJK, Berg S, Ayele BT, Alemu A, Guta S, Lakew M, Tadesse B, Gebre S, Wood JLN, Ameni G, The ETHICOBOTS consortium (2019) Prevalence of bovine tuberculosis and its associated risk factors in the emerging dairy belts of regional cities in Ethiopia. *Prev Vet Med.* 168, 81-89. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.04.010
- Orloski K, Robbe-Austerman S, Stuber T, Hench B, Schoenbaum M (2018) Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* isolated from livestock in the United States, 1989-2018. *Front Vet Sci.* 5, 1-10. doi: 10.3389/fvets.2018.00253
- Raphaka K, Sánchez-Molano E, Tsairidou S, Anacleto O, Glass EJ, Woolliams JA, Doeschl-Wilson A, Banos G. (2018) Impact of genetic selection for increased cattle resistance to bovine tuberculosis on disease transmission dynamics. *Front Vet Sci.* 5, 1-14. doi:10.3389/fvets.2018.00237
- Sayın Z. (2010) Sığır tüberkülozunun farklı metotlar ile karşılaştırmalı teşhisi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Viviani P, Tufan M, Kirandjiski T, Ediz B, Çağatay M, Aktaş S, Nazzarri N, Bozkurt Z, Özgenç Y, Kılınç B, Göral A, Özkan D, Agah H, Tizzani P, Diker KS, Akan M, Yılmaz H, Aydın L, Hasöksüz M, Altun S, Sensi M, Petrini S, Magistrali C, Karslıoğlu N, Budak N, Karakoyunlu İ, Coşgun E. (2016) Veteriner Hizmetleri Strateji Belgesi Nihai Raporu. Avrupa Birliği (Agrotec SPA) ve Tarım ve Orman Bakanlığı.
- Waters WR, Palmer MV, Buddle BM, Vordermeier HM. (2012) Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine.* 30, 2611-2622. doi:10.1016/j.vaccine.2012.02.018



The effect of physically effective neutral detergent fiber on milk composition and milk yield

Hasan Atalay^{1*}, Tanay Bilal², Bülent Ekiz³

¹ Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Balıkesir University, Balıkesir, Turkey.

² Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Turkey.

³ Department of Animal Breeding and Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 28.10.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 03.11.2021

Abstract: This study aims to examine the effect of the physically effective Neutral Detergent Fiber (peNDF) value of the roughage on milk composition and milk yield. Physically effective NDF varies depending on the particle length of the roughage and the amount of structural and non-structural carbohydrates in the ration. The quality, quantity, and particle length of the roughage are extremely important for rumen health. The longer the particle length of the roughage is, the more the cow ruminates and produces more saliva. The produced saliva is used to balance the rumen pH. It is aimed to protect rumen and animal health, to improve milk production and fertility, and to make more efficient animal husbandry with the optimum preparation of the physically effective NDF levels in the ration. Providing the balance of energy, protein, and fiber required by cows in the early lactation period, maximizing the microbial yield and protecting the rumen health are possible with the optimum NDF in the ration. In this period, it is aimed to maintain the lactation peak by promoting dry matter intake. In our study, it was observed that the difference between farms was significant for the milk composition properties of peNDF content and the number of somatic cells ($P < 0.001$). It has been determined that the difference between farms on the impact of peNDF value on daily milk yield is not significant.

Keywords: Physically effective NDF, lactation, rumen health, milk composition, milk yield

Fiziksel etkin nötral deterjan lif'in süt bileşimi ve süt verimi üzerine etkisi

Özet: Bu çalışmanın amacı kaba yemin fiziksel etkin Nötral Deterjan Lif değerinin süt bileşimi ve süt verimi üzerine etkisini incelemektir. Fiziksel etkin NDF kaba yemin partikül uzunluğuna ve rasyondaki yapısal olan ve olmayan karbonhidratların miktarına bağlı olarak değişmektedir. Rumen sağlığı açısından kaba yemin kalitesi, miktarı ve partikül uzunluğu son derece önemlidir. Kaba yemin partikül uzunluğu ne kadar artar ise inek o kadar fazla geviş getirir ve daha fazla tükürük üretir. Üretilen tükürük rumen pH'sını dengelemede kullanılmaktadır. Rasyondaki fiziksel etkin NDF düzeyinin optimum şekilde hazırlanması ile rumen ve hayvan sağlığının korunması, süt ve döl veriminin iyileştirilmesi ve daha verimli bir hayvancılık yapılması amaçlanmaktadır. Erken laktasyon dönemindeki ineklerin ihtiyacı olan enerji, protein ve lif dengesinin sağlanması ile mikrobiyal verimin en üst düzeye çıkarılması ve rumen sağlığını koruması rasyondaki optimum NDF ile mümkündür. Bu dönemde kuru madde alımının teşvik edilmesi ile laktasyon pikinin sürdürülmesi hedeflenmektedir. Çalışmamızda peNDF içeriğinin süt bileşimi özellikleri ve somatik hücre sayısı için işletmeler arası farklılığın önemli olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). peNDF değerinin süt verimi üzerinde işletmeler arası farklılığın önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fiziksel etkin NDF, laktasyon, rumen sağlığı, süt bileşimi, süt verimi

Introduction

Total Mixed Ration (TMR) is used in feeding dairy cattle in the world and our country. This system is the most suitable feeding system in terms of milk yield, fertility, and feeding costs. TMR is a feeding system that roughage and concentrate feed are mixed in the ration prepared according to the nutritional requirements of animals and presented as ad libitum.

In plants, carbohydrates are divided into two as structural and non-structural carbohydrates. The structural carbohydrates found in the cell wall are pectin, β -glucan, galactosides, arabinoxylan (pentosans), hemicellulose, cellulose, and lignin. Non-structural carbohydrates in the cell are organic acids, starch, and sugars. Carbohydrates are produced by photosynthesis and stored in plants. Vegetable carbohydrates consist of cell contents (sugars and

Yazışma adresi / Correspondence: Hasan Atalay, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Balıkesir University, Balıkesir, Turkey E-mail: hasanatalay@balikesir.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-5744-7538 • ²0000-0001-7258-6862 • ³0000-0001-6458-5747

starch) and cell wall elements (cellulose, hemicellulose, lignin). Among the carbohydrates, starch is abundant in grain feeds, and cellulose is abundant in roughages. Starch and cellulose are glucose molecules linked by different chemical bonds. Starch is digested by enzymes in the digestive system, while cellulose is digested by enzymes produced by microorganisms in the digestive system. Microorganisms also digest hemicelluloses in the digestive system and convert them into organic acids (volatile fatty acids), which are the primary energy source of the organism. The main component of the plant cell wall is cellulose. Cellulose is a homogeneous glucose polymer of glucose molecules linked by β -1,4 glycoside bonds. It is only found in cotton in its purest form. Hemicellulose is a heterogeneous polysaccharide with 5 and 6 carbons and linked by β -1,4 glycoside bonds such as xylose, arabinose, mannose, galactose, and glucose. Hemicellulose is soluble in diluted alkalis (NaOH), but cellulose is insoluble. Lignin has a structure like a glue that binds cellulose and hemicellulose together. Lignin is not a carbohydrate and has a water-repellent nature. The basic structure of lignin is phenyl propane derivative. Microorganisms in the rumen break down cellulose in feeds with the enzymes they synthesize and converted into volatile fatty acids, carbon dioxide, and methane gas. Thus energy is obtained (Kirchgeßner 1985).

Forage crops contained in roughages are crucial in feeding dairy cattle. Forage crops are indispensable for ruminant nutrition. Since forage crop cultivation is insufficient in Turkey, cattle breeding confronts a roughage shortage. The ration should include the amount of a nutrient that will promote the desired yield level according to the animals' genetic capacity. The forage crop should be harvested when it contains the most protein. This period is also the period when the amount of Neutral Detergent Fiber (NDF) is the least. Ration NDF rate should not exceed 30%, and the Acid Detergent Fiber (ADF) rate should not exceed 19% for cattle producing high milk yield. Animals like to consume high-quality roughage. When compared to high-quality alfalfa consumption, low-quality alfalfa consumption causes economic damage according to dry matter intake and milk yield rates. Planting fodder crops together (carbohydrates-rich Poaceae and protein-rich Legume) improves the quality of feed. The amount and ratio of fiber (NDF, ADF) found in forage crops determine the quality. The higher the fiber ratio in the fodder crop is, the lower the digestion

rate is. While the structural, fibrous carbohydrates, namely hemicellulose, cellulose, lignin in the cell wall form the NDF fraction, cellulose and lignin form the ADF fraction (Budak and Budak 2014).

The Weende chemical analysis method is used to determine the nutrients in the feed. While this method shows the chemical composition of feed nutrients as raw nutrient content, it shows cellulose, hemicellulose, lignin contents as crude cellulose. In the Van Soest analysis method, the chemical composition of feeds is divided into two as cell wall and cell contents. Van Soest's analysis method specifies the fibrous structures (cellulose, hemicellulose, and lignin comprising the cell wall) in the NDF, ADF, Acid Detergent Lignin (ADL), fractions. The Van Soest method is based on the principle of determining the remaining cell wall amount as NDF, ADF, ADL after the feed sample is boiled with acid and neutral detergent, filtered, dried, and weighed (Van Soest et al. 1991).

In recent years, NDF and ADF values have been used instead of raw cellulose (cellulose, hemicellulose, lignin) values. NDF and ADF values provide information about the amounts of some compounds in the plant's structure are difficult to digest and turn into energy, NDF and ADF values are extremely important for healthy, efficient, and correct animal nutrition. NDF can be characterized as the principal part of the plant cell wall. It contains compounds such as hemicellulose, cellulose, lignin. The NDF value of the feed is a ratio that determines the amount of dry matter that the animal can directly consume according to its body weight. ADF value is obtained by subtracting the amount of hemicellulose from the NDF value. The ADF value of the feed gives the digestible dry matter amount. The digestible dry matter consumption of the cow ensures the digestible energy to be calculated. The more digestible dry matter the animal consumes, the more energy it produces, and the more energy, milk, and meat it generates. The low ADF amount of the feed indicates that it has a high digestion degree and energy. The low amount of NDF and ADF in the feed shows that its consumption, digestion, and energy are high, while the high amount of NDF and ADF shows that its consumption, digestion, and energy are low. The digestibility degree of intracellular compounds (starches, fats, proteins, sugars, pectins) is much higher than cell wall compounds. Therefore, the forage cell wall components (NDF, ADF) should be at a low value. The excess amount of NDF and ADF

in the feed reduces dry matter consumption, digestibility, and energy intake. In the digestive system, indigestible feed materials prevent dry matter consumption as they create a feeling of satiety. Thus, the critical nutrients cannot be taken for high productivity. Easily digestible nutrients in the digestive system increase animal's dry matter consumption and energy. Minimum % NDF and % ADF requirements in the rations was reported as: NDF = 25-30 (Herdt 2014), 25-33 (NRC 2001), and ADF = 17-21 (NRC 2001). The animal consumption limit of the NDF was estimated as 1.2% of the animal's weight (Beauchemin 1996).

The TMR consumed by the cow contains 65-75% dry matter. Starch, pectin, and sugar must be high in TMR for maximum microbial protein formation. If the forage plant is harvested before or at the beginning of flowering, it contributes to the increase in milk yield. Roughages can be listed according to their quality as alfalfa hay, alfalfa silage, corn silage, hay silage, and wheat silage. In terms of the roughage ratio in TMR, if roughage NDF digestion increases, dry matter consumption and milk yield increase. If the amount of NDF in TMR is above 25%, the rumen pH value will be greater than 6. Grain feeds are listed as wheat, barley, oat, corn, and sorghum according to their decomposition rate in the rumen. Finely ground maize is better digested than crushed corn (Oba and Allen 1999).

This study aims to examine the effect of the physically effective NDF (peNDF) value of roughage on milk composition and milk yield.

Material and Method

Feed analysis: peNDF value, particle size. The study was carried out in two different commercial dairy farms in Balıkesir (coordinates: 39°42'31"N 27°53'11"E, 39°48'51"N 27°57'26"E). 0.5 kg of fresh TMR feed samples were taken separately from both dairy farms, brought to the laboratory in airtight bags, and kept at -20°C until analysis. After the feed samples were cut into small pieces (1 cm), they were dried in the oven at 65°C for 48 hours until the weight did not change and the nutrient levels were determined. TMR forage samples were ground in a 1 mm sieve mill (Retsch ZM 200 ultra centrifugal mill) for analysis. Nutrient values of TMR feed were analyzed according to AOAC (1990) for dry matter (method

934.01), Crude Ash (method 942.05), Crude Protein (method 954.01), Ether Extract (method 920.39), Crude Cellulose (method 962.09), and Starch (method 920.40). NDF, ADF, and ADL analysis of TMR feed samples were analyzed using the automatic fiber device Gerhard FT12 (2014) according to the methods reported by Van Soest et al. (1991). Penn State Particle Separator (PSPS) TMR was helpful to estimate particle size. The separator has three sieves and a sub-sieve (cup). The diameters of the sieves were 19 mm, 8 mm, 1.18 mm, respectively, from the top. Each TMR sample particle size was found by horizontally shaking at least 66-times per minute in PSPS. The physical efficacy factor (pef) was calculated as the percentage of particles retained on the 1.18 mm screen of PSPS. The peNDF value was determined by multiplying pef by the proportion of NDF in the TMR (Mertens 1997; Kononoff et al. 2003a; Yang and Beauchemin 2005).

Milk analysis: For preservative purposes, milk samples were collected into sterile sample containers containing potassium dichromate and brought to the laboratory under the cold chain. Protein and fat in the milk samples were determined using an autoanalyzer (Bentley Instruments Inc USA) according to the manufacturer's instructions and Iñón et al., (2004). Somatic cell numbers and total bacterial numbers were determined with the IRT method (IR FlexCam S, Infrared Solutions Inc USA), under ISO-21187/IDF 196, according to Berry et al. (2003) method.

Statistical analysis: The statistical analysis of milk composition properties was compared by General Linear Model analysis. In the current statistical model, farm, measurement month, and farm × measurement month interaction factors took place as fixed effects. An independent sample t-test was used to compare the dairy farms in terms of daily milk yield. Statistical analyzes were made using the SPSS 13.0 program.

Results

Table 1 shows the Nutrients Composition (DM%) of the TMR, Table 2 shows the particle size distributions, NDF, and peNDF values of the TMR (DM%), Table 3 shows the effect of peNDF value on milk composition and Table 4 shows the impact of peNDF value on milk yield.

Table 1. Nutrient composition (DM%) of total mixed ration (TMR).

Item	1 st Dairy Farm TMR	2 nd Dairy Farm TMR
DM %	49.28	52.48
EE	4.96	4.40
CP	16.82	16.75
CF	18.43	11.15
CA	7.22	7.83
Starch	22.17	32.39
NDF	37.07	30.08
ADF	26.14	18.75
ADL	3.16	2.86

DM= Dry Matter, EE= Ether Extract, CP=Crude Protein, CF= Crude Fiber, CA= Crude Ash, NDF= Neutral Detergent Fiber, ADF= Acid Detergent Fiber, ADL= Acid Detergent Lignin

Table 2. Particle sizes distribution, NDF, and peNDF values of the total mixed ration (DM%).

Particle size distribution (DM%)	1 st Dairy Farm TMR	2 nd Dairy Farm TMR
>19 mm	14.62	6.74
19-8 mm	42.08	36.50
8-1.18 mm	31.86	33.33
<1.18 mm (Pan)	18.42	23.41
pef ¹	0.81	0.76
NDF	37.07	30.08
peNDF ²	30.02	22.86

Table 3. The effect of physically effective NDF (peNDF) value on milk composition.

Item	1 st Dairy Farm		2 nd Dairy Farm		P-value
	Mean	SE	Mean	SE	
Milk fat %	3.89	0.021	4.47	0.015	<0.001
Milk protein %	3.01	0.009	3.09	0.006	<0.001
Milk lactose %	4.89	0.004	4.85	0.003	<0.001
Dry matter %	12.16	0.029	12.51	0.020	<0.001
Urea %	12.58	0.059	11.94	0.042	<0.001
Somatic cell count (cells/ml)	208.56	3.553	243.6	2.499	<0.001

Between-farm differences are significant in milk composition characteristics and somatic cell count (P <0.001).

Table 4. The effect of physically effective NDF (peNDF) value on milk yield.

Item	1 st Dairy Farm		2 nd Dairy Farm		P-value
	Mean	SE	Mean	SE	
Milk yield, kg/d	33.83	0.60	32.76	0.41	0.162

Discussion and Conclusion

It has been reported that the high peNDF content of the ration has no effect on feed intake, milk production, and milk composition, and also, the high digestibility resulting from the high peNDF in the ration does not significantly improve milk yield and milk composition in mid-lactating cows (Yang and Beauchemin 2005). It has been stated that when there is a sufficient amount of peNDF in the ration, the milk fat percentage may be constant (Gencoglu et al. 2007).

It has been stated that the decrease in particle size of corn silage and an increase in volatile fatty acid do not affect rumen pH (Kononoff et al. 2003b). Although chewing activity is closely related to roughage particle size, it has been reported that its effect

on rumen pH is small, and also, when the NDF level meets the recommended level, the specified factors other than particle size have critical importance on rumen pH level. Although small particle size clover silage-based feeding results in animals consuming more feed, it has been stated that milk yield is not affected by this situation (Kononoff and Heinrichs 2003c).

It has been suggested that peNDF measured by Penn State Particle Separator (PSPS) has a weak predictive effect on rumen pH level, but measuring particle size using PSPS can help understand the factors affecting feeding behavior (Kononoff and Heinrichs 2003d).

In a study in which cottonseed and DDG roughages were used instead of alfalfa silage, according

to the milk fat test, the ration peNDF values were found 58% and 31.5%, respectively. It was stated that these peNDF rates did not affect milk yield but caused an increase in milk fat and protein yield (Clark and Armentano 1993). The current study is also consistent with these results, and it has been observed that the 30.91% and 22.86% of peNDF ratio of rations did not affect the milk yield and the milk composition properties.

In a study using alfalfa hay and wheat straw instead of corn silage, peNDF values were found between 33.24 and 36.30, and it was stated no effect on milk composition and yield (Gencoglu et al. 2007). Contrary to these results, in our study, peNDF values in the farms were different, between 22.86 and 30.02, and the difference between the farms were found significant in the milk composition characteristics and the number of somatic cells ($P < 0.001$).

Determining the NDF effectiveness for maintaining milk fat production and optimizing ruminal fermentation depends on the structural properties and particle length of NDF, which affects milk fat production, ruminal pH, and chewing activity (Mertens 1997).

In conclusion, there is no information available about the cattle's peNDF requirements in TMR. Besides, it is not known that whether the peNDF value has any effect on milk composition and milk yield. Therefore, more studies on peNDF are needed.

Author contributions: HA designed and carried out the experiments, BE statistical analysed the data, HA wrote the paper, TB critical reviewed.

Conflicts of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical Statement: This study does not present any ethical concerns.

References

- AOAC (1990) Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Washington, D.C. USA.
- Beauchemin K A. (1996) Using ADF and NDF in dairy cattle diet formulation-a western Canadian perspective. *Animal Feed Science and Technology*. 58, 101-111.
- Budak F, Budak F. (2014) Quality on forage plants and factors effecting forage quality. *Turkish J Sci Review*. 7, 1-6.
- Berry RJ, Kennedy AD, Scott SL, Kyle BL, Schaefer AL. (2003) Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Can J Anim Sci*. 83, 687-693. [https://doi: 10.4141/A03-012](https://doi.org/10.4141/A03-012).
- Clark PW, Armentano LE. (1993) Effectiveness of neutral detergent fiber in whole cottonseed and dried distillers grains compared with alfalfa haylage. *J Dairy Sci*. 76, 2644-2650. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77600-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77600-6).
- Iñón FA, Garrigues S, de la Guardia M. (2004) Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Anal Chim Acta*. 513, 401-412. [https://doi:10.1016/j.aca.2004.03.014](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.014).
- Gencoglu H, Turkmen II, Deniz G, Biricik H. (2007) The effect of partial replacement of corn silage on rumen degradability, milk production and composition in lactating primiparous dairy cows. *Ital J Anim Sci*. 6, 71-80. [https://doi: 10.4081/ijas.2007.71](https://doi.org/10.4081/ijas.2007.71).
- Herd T. (2014) Nutritional requirements of dairy cattle. MSD Merck Veterinary Handbook, Nov 2014. Kenilworth, NJ, USA: Merck, 1-9.
- Kirchgessner M. (1985) *Hayvan Besleme. Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri*. Çeviren Asım Kılıç, Tübitak Yayınları, Yayın No: 611 VHAG Seri No:21, Ankara.
- Kononoff PJ, Heinrichs AJ, Buckmaster DR. (2003a) Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *J Dairy Sci*. 86, 1858-1863. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73773-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73773-4).
- Kononoff PJ, Heinrichs AJ, Lehman AH. (2003b) The effect of corn silage particle size on eating behavior, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 86, 3343-3353. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73937-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73937-X).
- Kononoff PJ, Heinrichs AJ. (2003c) The effect of reducing alfalfa haylage particle size on cows in early lactation. *J Dairy Sci*. 2003 Apr;86(4), 1445-1457. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73728-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73728-X).
- Kononoff PJ, Heinrichs AJ. (2003d) The effect of corn silage particle size and cottonseed hulls on cows in early lactation. *J Dairy Sci*. 86, 2438-2451. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73838-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73838-7).
- Mertens DR. (1997) Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J Dairy Sci*. 80, 1463-1481. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76075-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2).
- National Research Council (NRC). (2001) *Nutrient requirements of dairy cattle Seventh edition*, Washington DC National Academies Press.
- Oba M, Allen MS. (1999) Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows, *J Dairy Sci*. 82, 589-596. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75271-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75271-9).
- Van Soest P, Robertson JB, Lewis BA. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 74, 3583-3597. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Yang WZ, Beauchemin KA. (2005) Effect of physically effective fiber on digestion and milk production by dairy cows fed diets based on corn silage. *J Dairy Sci*. 88, 1090-1098. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72776-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72776-4).



Anadolu Merinoslarında İrisin hormon yanıtı üzerine bazı fizyolojik parametrelerin etkisi

Bülent Bayraktar^{1*}, Emre Tekce²

¹ Bayburt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Bayburt, Türkiye

² Bayburt Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Bayburt, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 20.06.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 02.09.2021

Özet: Bu çalışmanın amacı, Anadolu Merinosu koyunlarında irisin hormon yanıtı üzerinde vücut kondüsyon skoru (VKS), laktasyon, gebelik, yaş ve cinsiyetin etkisinin incelenmesidir. Çalışmaya dahil edilen tüm gruplarda yer alan Anadolu Merinosu koyunları vücut kondüsyon skorlarına (VKS<2, VKS=3-3.5, VKS≥4) göre 3 gruba ayrılmıştır. 1.grup gebeliğin ilk dönemindeki koyunlar (ilk gebeliğin 100. gününde) (n=30), 2.grup erken laktasyon döneminde bulunan koyunlar (n = 30), 3.grup farklı yaşta bulunan <2 (genç) (n=30), 2-8 (ergin) (n=30), 8> (yaşlı) (n=30), erkek ve dişi koyunlar (n=180) olmak üzere toplam 240 hayvan oluşturdu. Koyunlardan sabah yemlemesi öncesi vena jugularis'ten kan örnekleri alındı. Kan serumu örneklerinde ELISA yöntemiyle irisin hormon düzeyleri belirlendi. Çalışma sonucunda laktasyon ve gebelik döneminde ortalama serum irisin hormon düzeyleri en düşük VKS<2 grubunda, en yüksek ise VKS ≥4 gruplarında bulunan koyunlarda saptanmıştır. Aynı şekilde farklı yaş ve cinsiyet gruplarında ise en düşük ortalama serum irisin hormon düzeyleri VKS<2 grubunda bulunan genç kuzu ve toklularda iken, en yüksek düzey ise VKS ≥4 grubunda yaşlı koyun ve koçlarda tespit edilmiştir. VKS değişimine bağlı olarak farklı yaş, cinsiyet, gebelik ve laktasyon dönemlerinin serum irisin hormonu düzeyi üzerine etkisi olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Sonuçlarımız, irisin hormonun miyokin olması ve fizyolojik rolü nedeniyle, kas sistemine ait durumun incelenmesinde yararlı bir parametre olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Cinsiyet, gebelik, irisin, koyun, laktasyon, vücut kondüsyon skoru, yaş

Effect of some physiological parameters on the hormone response of Irisin in Anatolian Merino Sheep

Abstract: The aim of this study was to examine the effect of body condition score (BCS), lactation, pregnancy, age and gender on the hormone response of irisin in Anatolian Merino sheep. Anatolian Merino sheep in all groups included in the study were divided into 3 groups according to their body condition scores (BCS<2, BCS=3-3.5, BCS≥4). 1st group, sheep in the first period of pregnancy (100 of the first pregnancy (n=30), 2nd group, of sheep found in early lactation period (n = 30), 3rd group consisted of <2 (young) (n=30), 2-8 (adult) (n=30), 8> (old) (n=30) ewe (n = 90) and rams (n = 90) were of different ages consisted of a total of 240 animals. Blood samples were taken from *vena jugularis* before the morning feeding of the sheep. Hormone levels of the iris were determined by ELISA method in blood serum samples. As a result of the study, mean serum irisin hormone levels during lactation and pregnancy were found in sheep in the lowest BCS<2 Group and the highest BCS ≥4 groups. In the same way, in different age and gender groups, the lowest mean serum irisin hormone levels were found in young lambs and Toks in the BCS<2 group, while the highest level was found in older sheep and Rams in the BCS ≥4 group. It was determined that different age, gender, pregnancy and lactation periods had an effect on serum irisin hormone level depending on BCS change (p<0,05). Our results showed that irisin can be a useful parameter in the examination of musculoskeletal state due to its myokine and physiological role.

Keywords: Age, body condition score, gender, irisin, lactation, pregnancy, sheep

Giriş

İrisin, 112 amino asitten oluşan ve 12 kDa moleküler ağırlığına sahip yakın zamanda keşfedilmiş bir miyokin ve adipokindir (Boström ve ark., 2012; Roca-Rivada ve ark., 2013). Ayrıca, fibronektin tip III domaini içeren protein 5 (FNDC5 / FRCP2 / PeP) olarak adlandırılan tip I membran proteini bölünmesinin

ürünüdür (Boström ve ark., 2012). İrisin, esas olarak iskelet kaslarının yanı sıra deri altı ve iç organ yağ dokularından salgılanan bir adipomiyokindir. İmmünohistokimyasal çalışmalar sonucunda testisler, karaciğer, pankreas, beyin, dalak, kalp ve mide tarafından daha küçük miktarlarda irisin üretildiği bildirilmektedir (Martinez Munoz ve ark., 2018).

İrisin hormonu, fiziksel aktivite sırasında miyositlerden salınarak kaslar ile diğer dokular ve organlar arasında bir bağlantı görevi görmektedir. Kas dokusunun çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesindeki rolü olan peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa (PGC-1 α) tarafından egzersize bağlı olarak iskelet kasında içeren fibronektin tip III Alan 5 (FNDC 5) uyarımı sonucunda üretilmektedir (Huh ve ark., 2012; Boström ve ark., 2012). Böylece, uncoupling protein-1 (UCP1) genin mRNA ekspresyonunu artırmasıyla birlikte beyaz yağ dokusu reseptörüne bağlanarak hücre membranındaki adenilatsiklaz enzimi aktive olmasıyla siklik adenozinmonofosfat (cAMP) artmaktadır. cAMP miktarının artışı, önce protein kinazı sonrasında hormona duyarlı lipaz sentezini aktive etmektedir. Bunun sonucunda beyaz yağ doku yoğun miktarda mitokondriye sahip kahverengi yağ dokusuna dönüşümü uyarılmaktadır. Böylece, enerji metabolizması, termogenenezin düzenlenerek vücut ısısının korunması yönünde düzenleyici bir etkiye sahiptir (Boström ve ark., 2012). Ayrıca, glikoz homeostazını iyileştirilmesiyle birlikte metabolik homeostazın sürdürülmesini sağlamakta ve düzenliliğinde metabolik bozukluk ve hastalıkların başlamasında neden olduğu bildirilmektedir (Stanford ve ark., 2013; So ve Leung, 2016; Mahgoub ve ark., 2018; Townsend ve Wright, 2019).

Vücut kondüsyon skoru (VKS), bel bölgesinde omurların üzeri ve etrafındaki yağ miktarı ve kas kalınlığının öznel bir değerlendirmesine dayanan, vücuttaki yağ düzeyini tespit etmede sübjektif bir yöntemdir (Thompson ve Meyer, 1994). VKS, sürünün beslenme durumu hakkında bilgi vermektedir. Kas dokudan salınan irisin hormonu, beden kitle indeksinin düzenlenmesinde efektif bir role sahiptir (Huh ve ark., 2012). Yaş ilerlemesiyle birlikte yağ doku miktarındaki artışla birlikte serum irisin hormon seviyesinin de yükseldiği bildirilmektedir (Ruan ve ark., 2017; Ruan ve ark., 2019). Meme dokusundan otonom olarak salgılanan irisin, yeni doğanlarda büyüme, enerji regülasyonu ve gastrointestinal sistemin gelişimi için önemli bir adipomyokindir (Mól ve ark., 2018). Ayrıca, üreme fonksiyonunda ve fetüs büyümesine bağlı olarak gerekli enerji ihtiyacının karşılanması ve gebeliğe bağlı metabolik değişikliklerde rolü bulunmaktadır (Ebert ve ark., 2014). Cinsiyet yönünden erkeklerde kadınlara göre daha yüksek serum irisin düzeyine tespit edildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Ruan ve ark., 2017; Ruan ve ark., 2019).

Gerçekleştirilen bu çalışmamızda, farklı vücut kondüsyon skorunda bulunan Anadolu merinosu ko-

yunlarında serumda irisin hormon düzeyi üzerine yaş, cinsiyet, gebelik, laktasyon dönemlerinin etkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, Bayburt ili merkez ilçesinde bulunan, entansif şartlarda yetiştirilen koyunculuk işletmesinde yapıldı. Araştırmada kullanılan hayvanlar aynı bakım ve her grubun kendi içerisinde tesadüfi deneme düzeni kullanılmasıyla oluşturulan 240 baş hayvan materyali kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm gruplarda yer alan Anadolu Merinosu koyunları vücut kondüsyon skorlarına (VKS <2, VKS=3-3,5, VKS \geq 4) göre 3 gruba ayrılmıştır. 1.grup gebeliğin ilk dönemindeki koyunlar (ilk gebeliğin 100. gününde) (n=30), 2.grup erken laktasyon döneminde bulunan koyunlar (n = 30), 3.grup farklı yaşta bulunan <2 (genç) (n=30), 2-8 (ergin) (n=30), 8>(yaşlı) (n=30), erkek ve dişi koyunlar (n=180) olmak üzere toplam 240 hayvan oluşturdu. VKS yönünden grupların oluşturulmasında, bel bölgesine yapılan palpasyon metoduyla belirlenmiştir (Khan, 1993). Thompson ve Meyer, 2006 tarafından bildirilen esaslar doğrultusunda Bel bölgesindeki kas ve yağ birikimine bağlı olarak VKS<2 (zayıf), VKS=3-3,5 (normal) ve VKS \geq 4 (şişman) olmak üzere puanlama yapılmıştır. Çalışma gruplarını oluşturulan hayvanların *vena jugularis*'lerinden sabah yemlemesinden önce kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar -80°C de saklandı. Serumda İrisin hormon seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Araştırma süresi boyunca, çevre ve yem faktörünün (Tablo-1) aynı olmasına dikkat edilmiştir.

Tablo 1: Temel rasyon besin madde içeriği (%)

Rasyon içeriği	Rasyon miktarı (%)
Arpa Kırmacı	18
Kepek	18
Fiğ Samanı	27
Yulaf Otu veya Yonca	37

Serum Örneklerinin Toplanması

Çalışma gruplarını oluşturan koyunların boyun toplardamarından (*vena jugularis*) anti koagülant içermeyen tüplere (VACUETTE® TUBE 9 ml Z Serum Clot Activator) 10 ml kan örneği alınmıştır. Tüplere alınmış olan kanlar laboratuvarında soğutmalı santrifüjde (NF 1200R, NÜVE, Ankara, TÜRKİYE) 3000 devir/dk da 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen serumlar steril epondorf tüplere aktarılmıştır. Laboratuvar analizleri gerçekleştirilene kadar -80°C'ye ayarlı derin dondurucularda muhafaza edilmiştir.

Serumda İrisin Hormon düzeyinin ölçümü

Araştırma sonucunda elde edilen koyunlara ait kan serum örneklerinde İrisin hormon düzeyinin ölçülmesinde kullanılan kitin minimum saptanabilir konsantrasyonu 0,2 ng/mL olarak bildirilmiştir. ELISA kiti türe özgü Sheep irisin (Sheep irisin (FNDC5) ELISA kit, Product code: SG-70787, CHINA), determinasyonu 2 ng/ml-90 ng/ml, intra assay katsayısı % 8,0, inter assay katsayısı %10 kullanılarak üretici firmanın kataloğunda belirtilen prosedüre uygun olarak çalışılmıştır.

Araştırmanın sonucunda elde edilen veriler IBM SPSS Statistics programında General Linear Model Univariate'de ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İncelenen değişkenler ve istatistiksel model ile aralarındaki etkileşimler aşağıda verilmiştir:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Burada, Y: gözlem, μ : ortalama, α : cinsiyet, β : yaş, γ : mevsim ve ε : ijkl: standart hata. Grup ortalamaları arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma testi ve tüm anlamlı farklılıklar $p < 0.05$ düzeyinde testlerle değerlendirilmiştir (Steel ve Torrie, 1980).

Bulgular

Çalışma grubunu oluşturan farklı yaş ve VKS'de bulunan yaş, cinsiyet, gebelik, laktasyon dönemlerinde serumda irisin hormon düzeyleri Tablo 2-3'de verilmiştir. Çalışma grubunu oluşturan farklı yaş= <2, 2-8, 8> yaş ve VKS aralığında VKS <2, VKS=3-3,5, VKS ≥ 4 bulunan koyunlara ait ortalama ve serumda İrisin hormon düzeyi sırasıyla en yüksek yaşlı VKS ≥ 4 koyunda 0,73 ng/ml, en düşük ise genç VKS <2 koyunda 0,45 ng/ml olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Aynı şekilde koçlara ait ortalama serum irisin hormon düzeyleri incelendiğinde en yüksek düzey yaşlı VKS ≥ 4 koyunda 0,63 ng/ml, en düşük ise genç VKS <2 koyunda 0,43 ng/ml olarak belirlenmiştir.

Diğer yandan gebelik döneminde bulunan Anadolu merinosu koyunlarına ait ortalama serum irisin hormon düzeyleri incelendiğinde en yüksek düzey VKS ≥ 4 bulunan koyunda 2,04 ng/ml, en düşük ise VKS <2 bulunan koyunda 0,58 ng/ml olarak belirlenmiştir. Laktasyon döneminde ise aynı şekilde serumda ortalama irisin hormon düzeyi en yüksek VKS ≥ 4 bulunan koyunda 0,64 ng/ml, en düşük ise VKS <2 bulunan koyunda 0,46 ng/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmamıza ait bulgular incelendiğinde VKS değişimine bağlı olarak farklı yaş ve cinsiyet, gebelik ve laktasyon dönemleri serum İrisin hormonu düzeyi üzerinde istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 2: Farklı yaş, cinsiyet ve VKS'de bulunan Anadolu Merinosu koyunlarında ortalama serum irisin hormon düzeyleri (ng/ml) ve istatistiksel karşılaştırılması (Ort.±SH)

Parametreler	N	Dişi			Erkek		
		VKS <2	VKS=3-3,5	VKS ≥4	VKS <2	VKS=3-3,5	VKS ≥4
Yaş=<2	66	0,45	0,48	0,51	0,43	0,43	0,47
Yaş=2-8	66	0,49	0,54	0,66	0,47	0,51	0,62
Yaş=8>	66	0,51	0,58	0,73	0,48	0,57	0,68
SEM				0,02			
Varyasyon kaynağı (P değerleri)							
Yaş				0,01			
Cinsiyet				0,01			
VKS				0,01			
Yaş * Cinsiyet				0,87			
Yaş * VKS				0,01			
Cinsiyet * VKS				0,54			
Yaş * Cinsiyet *VKS				0,92			
Hormon üzerine etkisi							
Yaş=<2				0,46 ^c			
Yaş=2-8				0,55 ^b			
Yaş=8>				0,59 ^a			
SEM				0,01			
VKS <2				0,47 ^c			
VKS=3-3,5				0,52 ^b			
VKS ≥4				0,61 ^a			
SEM				0,01			
Dişi				0,55			
Erkek				0,52			
SEM				0,01			
Hormon							
İrisin				0,53			
SEM				0,004			

VKS (Vücut Kondüsyon Skoru), Aynı sütündeki farklı harfler (a,b,c) istatistiki açıdan önemlidir (p<0,05).

Tablo 3: Anadolu Merinosu Koyunlarında Farklı VKS'lerine göre gebelik ve laktasyon döneminde serum irisin hormon düzeyleri (ng/ml) ve istatistiksel karşılaştırılması (Ort.±SH)

Parametreler	N	Gebe	Laktasyon
VKS <2	22	0,58 ^c	0,46 ^c
VKS=3-3,5	22	1,46 ^b	0,57 ^b
VKS ≥4	22	2,04 ^a	0,64 ^a
SEM			0,04
Varyasyon kaynağı (P değerleri)			
Gebelik			0,01
Laktasyon			0,01
VKS			0,01
Gebelik*Laktasyon*VKS			0,01

Parametreler	N	Gebe	Laktasyon
Hormon üzerine etkisi			
VKS <2			0,52 ^c
VKS=3-3,5			1,01 ^b
VKS ≥4			1,34 ^a
	SEM		0,03
Gebe			1,36
Laktasyon			0,56
	SEM		0,02
Hormon			
İrisin			0,96
	SEM		0,02

VKS (Vücut Kondüsyon Skoru), Aynı sütündeki farklı harfler (a,b,c) istatistiki açıdan önemlidir (p<0,05).

Tartışma ve Sonuç

Yapılan klinik araştırmalar, irisinin glukoz toleransını artırmasına ek olarak glukoz ve lipid seviyesi ile insülin duyarlılığını regülasyonunu sağlaması gibi önemli rolü bulunması nedeniyle metabolik özelliklerinden dolayı irisin, son zamanlarda pek çok araştırmacının ilgisini çeken araştırma konusudur (Boström ve ark., 2012). Yetersiz ve yanlış beslenmeye bağlı olarak koyunlarda görülen metabolik hastalıklar gebelik toksemisi, beyaz kas hastalığı, hipokalsemi, hipomagnezemi gibi küçükbaş hayvancılığın önemli sorunlarından birisidir. İntrasellüler Ca²⁺, kas kasılması, hormonal sekresyon, glikojen metabolizması gibi önemli fizyolojik süreçlerde düzenleyici rolü bulunmaktadır (Shuttleworth, 1997). Bu anlamda, İrisin Hormonu, hücre içi Ca²⁺ sinyallerini ve mitokondriyal termojeniz'i kontrol etmektedir. Diğer yandan, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ile iskelet kası hücrelerinde glukoz alımını düzenlemeindeki rolü nedeniyle metabolik sendrom, diyabet gibi hastalıklar için potansiyel bir biyolojik belirteç olarak kabul edilen çok fonksiyonlu bir hormondur (Martinez Munoz ve ark., 2018; Lee ve ark., 2015).

Gebelik ve laktasyon dönemleri, fizyolojik ve hormonal değişikliklerinin şekillendiği önemli bir süreçtir. Özellikle gebelik döneminde fetüsün besin ve enerji ihtiyacının karşılanmasında önemli glukoz, lipid ve protein metabolizması bu hormonal değişikliklerden etkilenmektedir (Bayraktar ve ark., 2020). İrisin hormonu ise glukoz toleransını artırarak enerji homeostazi ve metabolizma düzenlenmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Çalışmamızın esasını oluşturan İrisin hormonu gebelik sırasında plasentadan eksprese edilir ve tüm gebelik boyunca serum seviyeleri daha yüksek düzeyde bulunmaktadır (Garcés ve ark., 2014). Süt ve kolostrumda irisin hormon

düzeyinin yüksek düzeyde olmasının laktasyon sırasında meme dokusunun otonom üretimi sonucu şekillendiği bildirilmektedir (Bienertová-Vašků ve ark., 2012; Mól ve ark., 2018). Mevcut araştırmamız sonucunda Farklı VKS değişimine bağlı olarak gebelik ve laktasyon dönemlerinde ortalama serum irisin hormon düzeyi en düşük VKS <2, en yüksek ise VKS ≥4 gruplarında bulunan koyunlarda tespit edilmiştir. Verilerin analizi sonucunda gebelik, laktasyon ve VKS birlikte etkilerinin irisin hormon düzeyi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05), (Tablo 3). Çalışmamız koyunlarda VKS değişimine bağlı olarak gebelik ve laktasyon döneminde serum irisin hormon düzeylerinin incelendiği ilk çalışma niteliğindedir. Bu nedenle araştırmamız kısıtlılık göstermekle birlikte elde edilen sonuçlar literatür verileriyle ve benzer araştırma sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (Aydın ve ark., 2013, Bienertová-Vašků ve ark., 2012; Mól ve ark., 2018).

Yaş ilerlemesiyle birlikte yağ doku miktarındaki artışla birlikte serum irisin hormon seviyesinin de yükseldiği bildirilmektedir (Ruan ve ark., 2017; Ruan ve ark., 2019). Cinsiyet yönünden erkeklerde dişilere göre daha yüksek serum irisin düzeyine tespit edildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Ruan ve ark., 2017; Zügel ve ark., 2016). Çalışmamızın farklı VKS, yaş ve cinsiyetin etkisine ilişkin elde edilen veriler incelendiğinde irisin hormonun yaş ve VKS'nun ortalama üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (p<0,05). İrisin hormonun Yaş*Cinsiyet, Yaş*Cinsiyet *VKS ve Cinsiyet*VKS interaksyonu istatistiki açıdan etkisinin olmadığı (p>0,05) tespit edilmiştir (Tablo 2). Mevcut araştırmamız sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde yaş, cinsiyet, VKS, gebelik, laktasyon dönemlerinde irisin hormon düzeyleri sonuçlar, literatürde bildiri-

len benzer araştırma sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (Palacios-González ve ark., 2015; Ruan ve ark., 2019).

Sonuç olarak, bu çalışma ile farklı VKS'na sahip Anadolu Merinosu koyunlarında serumda irisin hormon düzeylerini, yaş, gebelik, laktasyon dönemlerinin etkisi ortaya koyulmuştur. Yakın zamanda keşfedilen irisin hormonu, hem adipokin hem de miyokin olması nedeniyle koyunlarda metabolik sendrom, beyaz kas hastalığı gibi bir çok metabolik hastalık ve rahatsızlığın değerlendirilmesi ve takibinde serumda ölçülebilen yeni, kullanışlı olabilecek prognostik öneme sahip biyomarker olacağını düşünüyoruz. Ancak bu alanda yapılan çalışmaların kısıtlı olmasından dolayı daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma, Bayburt Üniversitesi Yerel Etik Kurulu onayı (Karar tarihi ve sayısı: 04.09.2020/67) ile hayvan refahı ve hakları korunarak etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Aydın S, Kuloglu T, Aydın S. (2013) Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus. *Peptides*. 47, 66-70. doi:10.1016/j.peptides.2013.07.001
- Bayraktar B, Tekce E, Aksakal V, Takma Ç, Bayraktar FG, Şengül B. (2020) Effects of Race, Gender, Body Condition Score and Pregnancy on Serum Apelin Levels in Ewe. *J. Agric. Sci.* 26(3), 363-372. doi:10.15832/ankutbd.526907
- Bienertová-Vašků J, Bienert P, Zlámál F, Tomandl J, Tomandlová M, Dostálová Z, Vašků A. (2012) Visfatin is secreted into the breast milk and is correlated with weight changes of the infant after the birth. *Diabetes Res Clin Pract.* 96(3), 355-361. doi:10.1016/j.diabres.2011.06.009
- Boström, P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Spiegelman BM. (2012) A PGC1 α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463-468. doi:10.1038/nature10777
- Garcés MF, Peralta JJ, Ruiz-Linares CE, Lozano AR, Poveda NE, Torres-Sierra AL, Caminos JE. (2014) Irisin levels during pregnancy and changes associated with the development of preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 99(6), 2113-2119. doi:10.1210/jc.2013-4127
- Ebert T, Stepan H, Schrey S, Kralisch S, Hindricks J, Hopf L, Fasshauer M. (2014) Serum levels of irisin in gestational diabetes mellitus during pregnancy and after delivery. *Cytokine*. 65(2), 153-158. doi:10.1016/j.cyto.2013.11.009
- Huh JY, Panagioutou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, Mantzoros CS. (2012) FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism*. 61(12), 1725-1738. doi:10.1016/j.metabol.2012.09.002
- Khan K. (1993) Effects of Body Condition and PreLambing Supplementation on Ewe Productivity. MS Thesis, Oregon State University, 102p, Oregon, USA.
- Lee HJ, Lee JO, Kim N, Kim JK, Kim HI, Lee YW, Kim HS. (2015) Irisin, a novel myokine, regulates glucose uptake in skeletal muscle cells via AMPK. *Mol. Endocrinol.* 29(6), 873-881. doi: 10.1210/me.2014-1353
- Mahgoub MO, D'Souza C, Al Darmaki RS, Baniyas MM, Adeghate E. (2018) An update on the role of irisin in the regulation of endocrine and metabolic functions. *Peptides*. 104, 15-23. doi: 10.1016/j.peptides.2018.03.018
- Martinez Munoz IY, Camarillo Romero EDS, Garduno Garcia JDJ. (2018) Irisin a novel metabolic biomarker: present knowledge and future directions. *Int. J. Endocrinol* 2018,1-9. doi: 10.1155/2018/7816806
- Mól N, Zasada M, Tomasiak P, Klimasz K, Kwinta P. (2018) Evaluation of irisin and visfatin levels in very low birth weight preterm newborns compared to full term newborns-A prospective cohort study. *PLoS one*. 13(9), e0204835. doi: 10.1371/journal.pone.0204835
- Palacios-González B, Vadillo-Ortega F, Polo-Oteyza E, Sánchez T, Ancira-Moreno M, Romero-Hidalgo S, Antuna-Puente B. (2015) Irisin levels before and after physical activity among school-age children with different BMI: A direct relation with leptin. *Obesity*. 23(4), 729-732. doi: 10.1002/oby.21029
- Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Crujeiras AB, Pardo M. (2013) FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS one*, 8(4), e60563. doi: 10.1371/journal.pone.0060563
- Ruan Q, Huang Y, Yang L, Ruan J, Gu W, Zhang X, Yu Z. (2019) The effects of both age and sex on irisin levels in paired plasma and cerebrospinal fluid in healthy humans. *Peptides*. 113, 41-51. doi:10.1016/j.peptides.2019.01.004
- Ruan Q, Yang L, Ruan J, Gu W, Zhang Y, Bao Z, Yu Z. (2017) Age-Related Changes Of Irisin Levels In Plasma And Cerebrospinal Fluid Of Humans. *Innovation in Aging*. 1(1), 138-138. doi: 10.1093/geroni/igx004.555
- Shuttleworth TJ. (1997) Intracellular Ca²⁺ signalling in secretory cells. *J. Exp. Biol.* 200(2):303-314. doi: 10.1242/jeb.200.2.303
- So WY, Leung PS. (2016) Irisin ameliorates hepatic glucose/ lipid metabolism and enhances cell survival in insulinresistant human HepG2 cells through adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 78,237-247. doi: 10.1016/j.biocel.2016.07.022
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Goodyear LJ. (2012) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 123(1), 215-223. doi:10.1172/JCI62308.
- Steel RGD, Torrie JH. (1980) *Principles and Procedures of Statistics. A biometrical approach*. 2nd edition. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 20-90.
- Thompson J, Meyer H. (1994) Body Condition Scoring of Sheep. Oregon State University Extension Service;1-4.
- Thompson JM, Meyer H. (2006) Body Condition Scoring of Sheep. Proc. 52nd Bien. Spooner Sheep D. 2006; 28p.
- Townsend LK, Wright DC. (2019) Looking on the "brite" side exercise-induced browning of white adipose tissue. *Pflugers Arch.* 471(3), 455-465. doi: 10.1007/s00424-018-2177-1
- Zügel M, Qiu S, Laszlo R, Bosnyák E, Weigt C, Müller D, Schumann U. (2016) The role of sex, adiposity, and gonadectomy in the regulation of irisin secretion. *Endocrine*, 54(1), 101-110. doi: 10.1007/s12020-016-0913-x



Farklı Salmonella Typhimurium kökenlerinin taşıdıkları patojenite adası ve direnç genlerinin İn Silico analizi

Özge Ünlü¹, Mehmet Demirci², Akın Yığın³, Seda Ekici*⁴

¹ İstanbul Atlas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

² Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye.

³ Harran Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Sanlıurfa, Türkiye.

⁴ Veteriner Kontrol Merkezi Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 01.07.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 02.09.2021

Özet: *Salmonella typhimurium*, dünyada en sık izole edilen *Salmonella* serotiplerinden birisidir. Tüm genom analizi gibi yeni moleküler yöntemlerin gelişmesi ile, antibiyotik direnci ve farklı genlerin karşılaştırmalı analizleri daha kolay yapılabilmektedir. Çalışmamızda farklı *S. typhimurium* kökenlerine ait genomik verilerin incelenmesi ile, taşıdıkları patojenite adaları, MLST tipleri, sekans serotipleri ve direnç genleri açısından karşılaştırmalı in silico analizini gerçekleştirmeyi amaçladık. Çalışmamıza genomik verileri NCBI'da yer alan 15 farklı *S. typhimurium* kökeni dahil edildi. Kökenlerin birbirleri ile evrimsel olarak yakınlıkları CSI filogeni, antimikrobiyal direnç belirteçlerinin varlığı ise ResFinder yazılımı ile gerçekleştirildi. *Salmonella* kökenlerine ait patojenite adaları, MLST ve sekans serotip tespiti için sırasıyla SPIFinder, MLST ve SeqSero yazılımları kullanıldı. Çalışmamıza dahil edilen 15 *S. typhimurium* kökeninin birbirlerine %97 ve üstünde genomik benzerlik gösterdikleri tespit edildi. MLST analizlerine göre 9 köken (%60) ST19 olarak bulundu. Tüm kökenlerin SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-12, SPI-13, SPI-14 patojenite adalarını taşıdıkları gözlenirken, SGI1 patojenite adası sadece 3 kökende tespit edildi. Aminoglikozid direnci ile ilişkili *aac(6)-laa* geni tüm kökenlerde saptandı. Yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişimi, *S. typhimurium* gibi önemli enfeksiyon etkenlerine ait yeni moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Bu verilerin karşılaştırmalı in silico analizleri ile enfeksiyonlarda kullandıkları virülans genlerinin analizleri ve moleküler patogeneze mekanizmalarının aydınlatılması sağlanabilecektir.

Anahtar kelimeler: Direnç genleri, in silico analiz, *Salmonella* patojenite adası, *Salmonella typhimurium*.

In Silico analysis of pathogenicity island And resistance genes carried by different Salmonella Typhimurium strains

Abstract: *Salmonella typhimurium* is one of the most frequently isolated *Salmonella* serotypes in the world. With the path of the new strategy of analysis like whole genome, comparative analyzes of weakness and different genes can be done more easily. In our study, *S. typhimurium* has different origins, it is aimed for different purposes to analyze genomic data, calculus pathogens islands, belonging MLST, seqs types and silico genes. Our study included 15 different *S. typhimurium* strains whose local data were obtained in NCBI. Evolutionary affinities of origins with C. Pathogenicity islands of *Salmonella* origin, SPIFinder, MLST, and SeqSero software for MLST. It was determined that *Typhimurium* origins showed 97% and more genomic similarity. According to MLST analysis, origin 9 (60%) was found to be ST19. While all were observed to carry pathogenicity islands SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-12, SPI-13, SPI-14, only 3 were detected in SGI1 pathogenicity island. The aminoglycoside related *aac(6)-laa* gene was detected in all strains. It would seem that the course of sequencing techniques such as the next generation is to obtain a new epidemiological route for owners of *S. Typhimurium*. With these data comparative analyzes, virulence genes that can be applied and the analyzes that can be corrected can be elucidated.

Keywords: Resistance genes, in silico analysis, *Salmonella* pathogenicity island, *Salmonella typhimurium*.

Giriş

En yaygın zoonotik gıda kaynaklı enfeksiyonlardan birisi olan Salmonelloz, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur (Bahramianfard ve ark. 2021). Salmonelloz etkeni olan *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram negatif bir bakteridir. Fekal-oral yolla yayılır ve kontamine su ve yiyecekler yoluyla

ulaşabilir. Şu anda 2600'den fazla *Salmonella* serovarı tanımlanmıştır (Barilleau ve ark. 2021). *Salmonella enterica*'nın tifoid olmayan serovarları (NTS), dünya çapında gıda kaynaklı enfeksiyonların ve ishallerin önde gelen nedenleridir. NTS arasında, *S. typhimurium*, dünya çapında hastalardan en sık izole edilenlerden *Salmonella* serotiplerinden birisidir

Yazışma adresi / Correspondence: Seda Ekici, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 Keçiören-Ankara
E-posta: seda.ergen@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-5411-5925 • ²0000-0001-9670-2426 • ³0000-0001-9758-1697 • ⁴0000-0002-7982-5261

(Anderson ve Kendall 2017). İnsanlarda ve hayvanlarda *S. typhimurium*'un neden olduğu Salmonelloz vakaları enfeksiyon sonrası 24 saat içinde gelişen ateş, akut bağırsak iltihabı ve ishal ile karakterizedir (Gart ve ark. 2016). *S. typhimurium* neden olduğu enfeksiyonlar için aşı bulunmamaktadır ve antibiyotiklerle tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Çünkü *S. typhimurium* kökenleri birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmektedir (Anderson ve ark. 2021). Fenotipik antibiyotik testleri yanında son yıllarda tüm genom analizi (WGS) gibi yeni moleküler yöntemlerin gelişmesi ile antibiyotik direnç ve farklı genlerin karşılaştırmalı analizleri daha kolay yapılabilmektedir (Barilleau ve ark. 2021; Lermينياux ve ark. 2020). Bu yöntemler ile yapılabilecek karşılaştırmalı genomik analizler, bir türün tüm üyeleri tarafından paylaşılan genleri ve türler arasında değişken dağılımlara sahip genlerin ayrımını sağlayabilir. Horizontal gene transfer (HGT) bu paylaşıma neden olan esas yoldur. Gram negatif bakterilerde genomik veya patojenite adalarının HGT ile aktarımı gerçekleşebilir ve bu onlara yeni ekolojik işlevler, evrimsel sıçramalarını sağlayabilir. Hatta yeni konaklar kazanmasına yardım edebilir (Lermينياux ve ark. 2020). Patojenite adalarının bakteri evrimini ve yeni konaklara adaptasyonunu en iyi anlatabilecek model patojen *Salmonella*'lardır. Bu cinste toplam 24 patojenite adası tanımlanmıştır, ancak bu adaların hepsinin virülans faktörlerini taşıdığı deneysel olarak doğrulanmamıştır (Hayward ve ark. 2014; Lermينياux ve ark. 2020; Urrutia ve ark. 2014). Bizde bu çalışmamızda, tüm genom analizleri yapılarak genomik verileri açık veritabanlarında yer alan 15 farklı *S. typhimurium* kökeninin karşılaştırmalı *in silico* analizini gerçekleştirmeyi ve taşıdığı direnç genlerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza tüm genom analizleri yapılarak genomik verileri açık veritabanlarında yer alan 15 farklı *S. typhimurium* kökeni dahil edilmiştir. Bu kökenlere ait fasta dizileri NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanından indirilerek çalışmamızda *in silico* analizleri amacıyla kullanıldı. Karşılaştırmalı *in silico* genomik analiz için çalışmamıza dahil edilen kökenlere ait bilgiler Tablo 1'de verildi.

Kökenlerin birbirleri ile evrimsel olarak yakınlıkları CSI filogeni yazılımı ile (<https://www.genomepidemiology.org/>) gerçekleştirildi (Kaas ve ark. 2014). Kökenlerde bulunan antimikrobiyal direnç belirteçlerinin varlığı ResFinder 4.1 online yazılımı kullanılarak tespit edildi (Bortolaia ve ark. 2020). Kökenlerin çoklu lokus dizi tiplendirmeleri MLST 2.0

(Multi-Locus Sequence Typing) online yazılımı ile gerçekleştirildi (Larsen ve ark. 2012). *Salmonella* kökenlerine ait patojenite adalarının tespiti için SPiFinder 2.0 online yazılımı kullanıldı (Roer ve ark. 2016). Kökenlerin dizi analizleri üstünden Kauffmann White şemasına göre serotipleri (O antijen: H1 antijen: H2 antijen) SeqSero yazılımı kullanılarak tespit edildi (Zhang ve ark. 2015).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen *S. typhimurium* kökenlerinin NCBI erişim numaraları.

NCBI numarası	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
1	AE006468.2
2	CP001363.1
3	CP009102.1
4	CP012681.1
5	CP014536.1
6	CP014965.1
7	CP014967.1
8	CP014975.1
9	CP014979.2
10	CP014983.1
11	CP016385.1
12	CP024619.1
13	CP034719.1
14	CP067091.1
15	CP067397.1

Bulgular

Çalışmamıza dahil edilen 15 *S. typhimurium* kökeninin ATCC 13311 kökenine göre birbirlerine olan benzerlikleri incelendiğinde, *S. typhimurium* CDC 2011K-1702 kökeninin %100 benzer olduğu görüldü. BL10 kökeni %97.56'lık benzerlik oranı ile en uzak evrimsel benzerliğe sahip köken olarak tespit edildi (Tablo 2, Şekil 1).

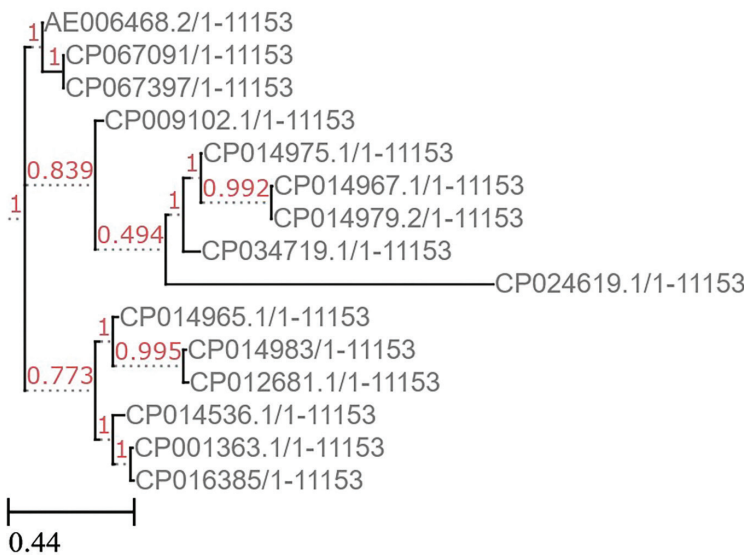
Çalışmamıza dahil edilen kökenlerin dizi analizi üstünden Kauffmann White şemasına göre serotipleri (seqsero; O antijen: H1 antijen: H2 antijen) incelendiğinde, 4:i:1,2 tipi kökenlerin 13'ünde tespit edildi, 2 köken ise 4:b:e,n,x olarak bulundu (Tablo 2). MLST analizlerine göre 15 *S. typhimurium* kökeninin 9'u (%60) ST19 olarak tespit edilirken, 2 köken (%13.3) ST8128 olarak tespit edildi. (Tablo 2). Kökenlerdeki antibiyotik direnç genleri ResFinder 4.1 programı ile incelendiğinde, tüm kökenlerde aminoglikozid direnci ile ilişkili *aac(6')-Iaa* geni tespit edildi (Tablo 2). SG11 patojenite adası içeren kökenlerde, *blaCARB-2*, *sul1* direnç genlerinin ortak ola-

rak bulunduğu tespit edildi. *S. typhimurium* 33676 kökeninde *aac(6')-laa* geni yanında florokinolon direnci ile ilişkili *gyrA* geni bulunurken, SGI1 patojenite adası içeren 2 kökende *aac(6')-laa*, *blaCARB-2*, *sul1* genleri yanında, *aadA2b*, *floR*, *tet(G)* genleri tespit edildi. Sadece *S. typhimurium* ER3625 kökeninde *aac(6')-laa* yanında yine aminoglikozid direnci ile ilişkili *aph(3')-IIa* geni saptandı (Tablo 2).

Çalışmamıza dahil edilen kökenlerin taşıdıkları *Salmonella* patojenite adaları incelendiğinde, tüm kökenlerde SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-12, SPI-13, SPI-14 patojenite adalarını taşıdıkları gözlemlendi. SGI1 patojenite adası sadece 3 kökende tespit edilirken, C63PI 10 kökende, CS54_island ise 14 kökende bulundu (Tablo 3).

Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen kökenlerin benzerlik, SeqSero, MLST ve antibiyotik direnç genlerinin dağılımı.

	NCBI Accession Numbers	Sequence Identity	SeqSero	MLST Sequence Type	ResFinder
1	AE006468.2	99.69	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i>
2	CP001363.1	99.26	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i>
3	CP009102.1	100	4:i:1,2	2066	<i>aac(6')-laa</i>
4	CP012681.1	97.93	4:i:1,2	213	<i>aac(6')-laa</i> , <i>gyrA</i>
5	CP014536.1	99.92	4:i:1,2	302	<i>aac(6')-laa</i>
6	CP014965.1	98.77	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i>
7	CP014967.1	100	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i> , <i>blaCARB-2</i> , <i>sul1</i>
8	CP014975.1	99.78	4:i:1,2	19	<i>aadA2b</i> , <i>aac(6')-laa</i> , <i>blaCARB-2</i> , <i>sul1</i> , <i>floR</i> , <i>tet(G)</i>
9	CP014979.2	99.6	4:i:1,2	19	<i>aadA2b</i> , <i>aac(6')-laa</i> , <i>blaCARB-2</i> , <i>sul1</i> , <i>floR</i> , <i>tet(G)</i>
10	CP014983.1	98.9	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i>
11	CP016385.1	99.86	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i>
12	CP024619.1	97.56	4:i:1,2	36	<i>aac(6')-laa</i>
13	CP034719.1	99.22	4:i:1,2	19	<i>aac(6')-laa</i>
14	CP067091.1	98.97	4:b:e,n,x	8128	<i>aac(6')-laa</i> , <i>aph(3')-IIa</i>
15	CP067397.1	99.01	4:b:e,n,x	8128	<i>aac(6')-laa</i>



Şekil 1. Çalışmaya dahil edilen *S. typhimurium* kökenlerinin evrimsel ağaç analizi.

Tablo 3. Çalışmaya dahil edilen kökenlerin taşıdıkları *Salmonella* patojenite adalarının dağılımı.

	NCBI Erişim numarası	Salmonella Patojenite Adaları											
		C63PI	CS54_ island	SGI1	SPI-1	SPI-2	SPI-3	SPI-4	SPI-5	SPI-9	SPI-12	SPI-13	SPI-14
1	AE006468.2				+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	CP001363.1		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	CP009102.1		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	CP012681.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	CP014536.1		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	CP014965.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	CP014967.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	CP014975.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	CP014979.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	CP014983.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	CP016385.1		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	CP024619.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	CP034719.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	CP067091.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	CP067397.1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tartışma ve Sonuç

Salmonelloz morbidite ve mortalitede artışa sebep olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. *Salmonella* türlerinin 2600'den fazla serotipi bulunmakta olup, bulaşları başlıca kontamine su ve gıdalar aracılığı ile fekal-oral yolla olmaktadır (Bahramianfard ve ark. 2021; Barilleau ve ark. 2021). Antimikrobiyal direnç paternleri serotipler arasında varyasyon göstermekte olup, *S. enteritidis* gastroenterit olgularından en fazla izole edilen serotip olmasına rağmen, ikinci en sık izole edilen serotip olan *S. typhimurium* daha fazla direnç geliştirme potansiyeline sahiptir (Unlu ve ark. 2018). Aynı zamanda bu serotipe ait kökenlerde 24 farklı patojenite adasının tanımlanmış olması, kökenlerin virulans potansiyelini ortaya koymaktadır (Hayward ve ark. 2014; Lerminiaux ve ark. 2020; Urrutia ve ark. 2014). *S. typhimurium* kökenlerinde artan antimikrobiyal direnç tedavi seçeneklerini sınırlandırmakta, kökenlerde gelişen direncin ve sahip olduğu patojenite adalarının monitorizasyonunu zorunlu kılmaktadır. Konvansiyonel antibiyotik duyarlılık testlerine ek olarak son yıllarda tüm genom analizi (WGS) gibi yeni moleküler yöntemlerin gelişmesi ile antibiyotik direnci ve farklı genlerin karşılaştırmalı analizleri daha kolay yapılabilmektedir (Barilleau ve ark. 2021; Lerminiaux ve ark. 2020). Biz de çalışmamızda, tüm genom analizleri yapılarak genomik verileri açık veritabanlarında yer alan 15 farklı *S. typhimurium* kökeninin karşılaştırmalı in silico

analizini gerçekleştirmeyi ve taşıdığı direnç genlerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamız MLST analizlerine göre 15 *S. typhimurium* kökeninin 9'u (%60) ST19 olarak tespit edildi. ST19 klonu tüm dünyada zoonotik gastroenterit etkeni olmakla birlikte, sistemik enfeksiyon potansiyeli ST313 gibi diğer klonlara kıyasla yüksek olmadığı bildirilmiştir (Carden ve ark. 2015). Ancak çalışmamıza dahil edilen örneklerden ST19 klonuna ait bir kökenin (Accession number: CP016385) kandan izole edilmiş olması klonun invazyon yeteneğini ortaya koymaktadır. Ayrıca ST19 klonu olarak saptanan üç ayrı kökende aminoglikozid direncinden sorumlu *aac(6')-Iaa* geni, karbenisilin direncinden sorumlu *blaCARB-2* ve sulfonamid direncinden sorumlu *sul1* geni birlikte saptandı. Monte ve ark. (2020) North Carolina'dan izole edilen beş ST19 kökeninin tümünde carbenicillinase [*blaCARB-2*], aminoglycosides [*aac(6')-Iaa* ve *aadA2b*], sulfonamide [*sul1*], tetracycline [*tetG*], ve florfenicol [*floR*] direncinden sorumlu genlerin birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte çalışmamızda tüm kökenlerde *aac(6')-Iaa* aminoglikozid direnç geni saptanmıştır. Rau ve ark. (2020) Brezilya Tarım bakanlığı, gıda kaynaklı patojenlerin kontrolü ulusal programı (Brazilian National Program for the Control of Foodborne Pathogens of Ministry of Agriculture) için topladıkları 490 *Salmonella* kökeninin sekizinde kolistin direncinden sorumlu *mcr-1* genini saptamışlar ve bu geni taşıyan kökenlerin farklı antibiyotiklere

de dirençli olduğunu saptamışlardır. Bu kökenlerde kolistin direncine ek olarak, yedi kökenin ampisiline, altı kökenin tetrasikline, ayrıca farklı beşer kökende nalidiksik asit, kloramfenikol, siprofloksasin ve gentamisine karşı direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir. *In silico* analizler sonrası elde ettiğimiz sonuçlarımız literatürle uyumlu görülmektedir. *S. typhimurium* kökenlerinin çoklu dirence neden olabilen farklı direnç genlerini taşıdığı görülmüştür. Birbirlerine filogenetik açıdan benzer kökenlerin taşıdıkları genleri birbirlerine aktarabilecek yetenekte olmaları da bu kökenlerin genomik epidemiyolojik verilerinin tabii zorunlu kılmasıdır.

Birçok enterik patojenden farklı olarak tümü virulan kabul edilen *Salmonella*'lar doğaları gereği hastalık oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Patojenin konağı invazyonu sürecinde "Salmonella Patojenite Adaları" olarak isimlendirilen farklı genetik lokuslar rol oynar. *S. typhimurium* kökenlerinde 24 farklı patojenite adasının tanımlanmıştır. SPI-1 ve PI-2 bunlardan en fazla çalışılmış olanlarıdır. SPI-1 fagositoz yapmayan hücrelerin invazyonu ve gastrointestinal epitele penetrasyon gibi enfeksiyonun başlangıç evrelerinde etkili olurken, SPI-2 ise sistemik yayılım ve konak organlara kolonizasyon gibi enfeksiyonun daha geç safhalarında gereklidir. SGI1, ilk olarak epidemik *S. typhimurium* DT104 klonunda saptanmış olup, çoklu antibiyotik direnç genlerini (ACSSuT) taşıyan integronları içerirken, C63PI demir alım sistemi ile, CS54 island ise intestinal kolonizasyon ve persistans ile ilişkilidir (Hayward ve ark. 2014; Boyd ve ark. 2000; Patchanee ve ark. 2020). Boyd ve ark. (2000) ACSSuT tipi direnç paterninden (pentaresistance) sorumlu *aadA2*, *floR*, *pse-1*, *sul1* ve *tet(G)* genlerinin, horizontal gen transferi ile ilişkili faj ve plazmid genlerini de taşıyan SGI-1'de kümelenildiğini bildirmişlerdir. Patchanee ve ark. (2020) Tayvan Chiang Mai ve Lamphun bölgelerinde domuz üretim zincirlerinden 2011-2014 yılları arasında sekanslanan 19 *S. typhimurium* kökenlerini *in silico* analiz ettikleri çalışmalarında tüm kökenlerin ST34 klonuna ait olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda tüm kökenlerde aminoglikozid ve beta laktam direnç genleri bulunduğunu ve yine kökenlerin tümünün 7 patojenite adasını taşıdığını tespit etmişlerdir. İlyas ve ark. (2017) derlemelerinde, horizontal gen transferinin *S. typhimurium* kökenleri için çok önemli olduğunu, bunun için SPI'ları kullandıklarını ve virülans genlerinin ufak değişimleri ile birçok hücre tipini enfekte edebileceğini ve çok şiddetli enfeksiyonlarla karşımıza çıkabileceğini belirtmişlerdir. *In silico* olarak incelediğimiz *S. typhimurium* kökenlerinde 16 farklı patojenite

adası saptadık. Tüm kökenlerde SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-12, SPI-13, SPI-14 saptanırken, SGI1 sadece üç kökende, C63PI 10 kökende, CS54_island ise 14 kökende saptandı. SGI1 taşıyan kökenlerin literatüre paralel olarak çoklu ilaç direnci gösterdiği saptanmış olup, *aac(6)-Iaa*, *blaCARB-2*, *sul1*, *aadA2b*, *floR*, *tet(G)* direnç genleri bir arada tespit edildi. İlyas ve ark. (2017) belirttiği gibi, SPI-2, SPI-11, SPI-12, SPI-13 kökenlerin makrofajlarda yaşaması için gerekli patojenite adaları olarak görülmektedir. SPI-14'de SPI-1 genlerinin regülasyonu ve invazyon için gerekli görülmektedir. SPI-9'da farelerde yapılan çalışmalarda *Salmonella* kökenlerinde biyofilm oluşumu ile ilişkili virülans genleri için önemli olarak tespit edilmiştir (Velásquez ve ark. 2016). Tüm kökenlerde saptadığımız SPI'lar, bu görevleri dolayısıyla enfeksiyonlarda görev alması gereken virülans genlerini taşımaları açısından önemli olduğu görülmektedir ve literatürle uyumludur.

Tüm genom analizi verileri kullanılarak yapılan sekans serotip analizleri son yıllarda geliştirilmiştir ve birbirlerine filogenetik açıdan %95 ve üstünde benzer kökenlerde oldukça başarılı olduğu antijenik serotipleme yerine genomik verilerle altın standart olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Banerji ve ark. 2020; İbrahim ve ark. 2018). Bizde çalışmamızda kökenlerimizin WGS verilerini kullanılarak seqserotipleri tespit ettik. İncelediğimiz *S. typhimurium* kökenlerinde 2 farklı seqsero saptadık. Singh ve ark. (2021) Florida'da tüm *Salmonella* kökenleri üstüne yaptıkları analizde çalışmamız sonuçlarına benzer şekilde tek 4:i:1,2 seqserotipi saptadıklarını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada MLST analizlerinde ST19'u en yüksek sayıda saptadıklarını ve kökenlerin 65'inin ST19 olarak olduğunu bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2021) yılında çalışmalarında evcil köpeklerden elde ettikleri 5 *S. typhimurium* kökeninin 1'inin ST19 olduğunu bildirmişlerdir. Serotip ve MLST analizi sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamıza dahil 15 *S. typhimurium* kökenine ait genomik verilerin *in silico* analizi ile bu kökenlerde sabit SPI'ların taşındığı tespit edilmiştir. Farklı kökenler olmalarına karşın birbirlerine %97 ve üstünde genomik benzerlik gösterdikleri tespit edildi. MLST analizinde ST19'un baskın olduğu bulundu. Yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişimi, *S. typhimurium* gibi önemli etkenlere ait yeni moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Bu verilerin karşılaştırılması *in silico* analizleri ile enfeksiyonlarda kullandıkları virülans genlerinin analizleri ve moleküler patogeneze mekanizmalarının aydınlatılması sağlanabilecektir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Anderson C.J., Kendall M.M. (2017). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strategies for Host Adaptation. *Front Microbiol.* 2017;8:1983.
- Anderson C. J., Medina, C. B., Barron, B. J., Karvelyte, L., Aaes, T. L., Lambertz, I., Ravichandran, K. S. (2021). Microbes exploit death-induced nutrient release by gut epithelial cells. *Nature*, 1-6.
- Bahramianfard H, Derakhshandeh A, Naziri Z, Khalbadi Farahani R. (2021). Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella* Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. *BMC Vet Res.* 2021;17(1):196.
- Banerji S, Simon S, Tille A, Fruth A, Flieger A.(2020). Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. *Sci Rep.* 9;10(1):4333.
- Barilleau E, Védrine M, Koczerka M, et al.(2021). Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of *Salmonella* Typhimurium. *BMC Microbiol.* 21(1):153.
- Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 1;75(12):3491-3500.
- Boyd, D.A., Peters, G.A., Ng, L.K., and Mulvey, M.R. (2000). Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 189: 285– 291
- Carden S, Okoro C, Dougan G, Monack D. (2015). Non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. *Pathog DiS.* 73(4):ftu023.
- Gart E.V., Suchodolski J.S., Welsh T.H. Jr, Alaniz R.C., Randel R.D., Lawhon S.D.(2016). *Salmonella* Typhimurium and Multidirectional Communication in the Gut. *Front Microbiol.* 2016;7:1827.
- Hayward M.R., AbuOun M., La Ragione R.M., Tchórzewska M.A., Cooley W.A., Everest D.J., Petrovska L., Jansen V.A., Woodward M.J. (2014). SPI-23 of *S. Derby*: role in adherence and invasion of porcine tissue. *PLoS One.* 19;9(9):e107857.
- Ibrahim G.M., Morin P.M. (2018). *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Front Microbiol.* 13;9:2993.
- Ilyas B, Tsai CN, Coombes BK. (2017). Evolution of *Salmonella*-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:428.
- Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O.(2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platform. *PLoS One.* 11;9(8):e104984.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355-61.
- Lerminiaux NA, MacKenzie KD, Cameron ADS. (2020). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1): The Evolution and Stabilization of a Core Genomic Type Three Secretion System. *MicroorganismS.* 8(4):576.
- Monte DFM, Sellera FP, Lopes R, Keelara S, Landgraf M, Greene S, et al. (2020) Class 1 integron-borne cassettes harboring blaCARB-2 gene in multidrug-resistant and virulent *Salmonella* Typhimurium ST19 strains recovered from clinical human stool samples, United State. *PLoS ONE* 15 (10): e0240978.
- Patchanee P, Tanamai P, Tadee P, Hitchings MD, Calland JK, Sheppard SK, Meunsene D, Pascoe B, Tadee P. (2020). Whole-genome characterisation of multidrug resistant monophasic variants of *Salmonella* Typhimurium from pig production in Thailand. *PeerJ* 8:e9700
- Rau RB, de Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR, Barth AL. (2020). *Salmonella enterica* mcr-1 Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. *Foodborne Pathog DiS.* 17(3):202-208.
- Roer L, Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, Kaas RS, Hasman H, Aarestrup FM.(2016). Is the Evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Linked to Restriction-Modification Systems? *mSystemS.* 2016;1(3):e00009-16.
- Singh N, Li X, Beshearse E, Blanton JL, DeMent J, Havelaar AH.(2021). Molecular Epidemiology of Salmonellosis in Florida, USA, 2017-2018. *Front Med (Lausanne).* 8:656827.
- Unlu O, Aktas Z, Tugrul HM.(2018). Analysis of Virulence Factors and Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Using Molecular Techniques and Identification of Clonal Relationships Among the Strain. *Microb Drug Resist.* 2018 Dec;24(10):1475-1482.
- Urrutia IM, Fuentes JA, Valenzuela LM, Ortega AP, Hidalgo AA, Mora GC.(2014). *Salmonella* Typhi shdA: pseudogene or allelic variant? *Infect Genet Evol.* 2014;26:146-52.
- Velásquez JC, Hidalgo AA, Villagra N, Santiviago CA, Mora GC, Fuentes JA.(2016). SPI-9 of *Salmonella enterica* serovar Typhi is constituted by an operon positively regulated by RpoS and contributes to adherence to epithelial cells in culture. *Microbiology (Reading).* 162(8):1367-1378
- Zhang S, Yin Y, Jones MB, Zhang Z, Deatherage Kaiser BL, Dinsmore BA, Fitzgerald C, Fields PI, Deng X. (2015). *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *J Clin Microbiol.* 53(5):1685-92.
- Yang C, Shao W, Wei L, Chen L, Zhu A, Pan Z. (2021). Subtyping *Salmonella* isolated from pet dogs with multilocus sequence typing (MLST) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). *AMB ExpressS.* 11(1):60.



Hidrojen peroksit dekontaminasyon etkinliğinin belirlenmesine yönelik mikrofluidik katalaz biyosensörü: Mikrobiyal optimizasyon

Ahmet Keskin¹ , Ahmet Koluman^{2*}

¹Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Pamukkale, Denizli.

Geliş Tarihi / Received:24.06.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 27.09.2021

Özet: Biyolojik suçlar (biyoterörizm dahil) gibi biyolojik riskler, mikroorganizmaların bulaşmasına yol açarak dekontaminasyon gerektirmektedir. Dekontaminasyon, mikroorganizmanın yayılmasını kontrol etmek için kritik bir noktadır. Dekontaminasyon için birçok kimyasal kullanılmaktadır. Ancak ekonomik ve seçkin antimikrobiyal özelliklerinden dolayı hidrojenperoksitin (H₂O₂) uygulamasında sıklıkla kullanılır. Dekontaminasyon sürecini izlemek için uygun bir sistem bulunamamıştır. Bu çalışmada, H₂O₂ uygulamalarının etkinliğini taramak için katalaz pozitif olduğu bilinen *Staphylococcus aureus* kullanarak bir bakteriyel mikrofluidik (mikroakışkan) biyosensör tasarladık. Bu çalışmada öncelikle, kurutma prosesi ve prosesin validasyonu ile ilgili olarak çalışmanın mikrobiyal optimizasyon kısmı hazırlanmıştır. Sonuçlar, kurutmanın katalaz reaksiyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığını ve satışta bulunan dekontaminantların bu yaklaşımla değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biyotoksik, dekontaminasyon, hidrojenperoksit, staphylococci, validasyon.

Microfluidic catalase biosensor designed for efficacy of hydrogenperoxide decontamination: Microbial optimization

Abstract: Microfluidic catalase biosensor designed for efficacy of hydrogenperoxide decontamination: Microbial optimization Abstract Bio-risks, like bio-crimes (including bioterrorism), lead contamination with microorganism that needs decontamination. Decontamination is a critical point for controlling spread of microorganism. Many chemicals are used for decontamination where hydrogenperoxide (H₂O₂) is massively applied due to its antimicrobial properties. However, no applicable system found to screen the process of decontamination. We designed a bacterial microfluidic biosensor using *Staphylococcus aureus*, which is known to be catalase positive, to screen efficacy of H₂O₂ applications. In this study we are representing the microbial optimization part of the study with respect to drying process and validation of the process. The results showed that drying had no effect on the catalase reaction and retail decontaminants can be evaluated with this approach.

Keywords: Biorisk, decontamination, hidrojenperoksit, staphylococci, validation.

Giriş

Biyosensörler, kalitatif veya kantitatif olarak sonuç vermek üzere geliştirilmiş, hızlı tespit sistemleridir. Sistemde analit ile spesifik biyoaktif bir bileşenin etkileşimi sonucu ortaya çıkan sinyalin, bir ölçüm sistemiyle değerlendirilmesi hedeflenir. Biyosensörler, genel olarak üç ana bölümden oluştuğu bildirilmektedir. Bunlar; Analit/reseptör, dönüştürücüler ve sinyal işleyicilerdir (Young ve Mutharasan 2005; Mehrotha 2016; Aldrami 2018).

Bir mikroorganizmanın bütün olarak bir yüzeye stabilize edilerek, mikroorganizmada mevcut biyokimyasal reaksiyonların kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler raf ömrü, ekonomiklik ve uygulama kolaylığından dolayı birçok alanda kullanılmaktadır (Yagi 2006). Mikrobiyal biyosensörler biyotoksinlerin tespitinde (Banerjee ve ark. 2013), oksidatif DNA hasarı tespitinde (Knight 2004; Mitchell ve Gu 2004; Ahn ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012) kullanılmıştır.

Mikrofluidik yapılar gaz kromatografisi analizlerinde kullanılmak üzere 70'li yıllarda geliştirilmiştir. Çalışma prensibi, kimyasal analizde numune veya reaktif miktarını kapillerler yardımı ile azaltmak hedefine dayanmaktadır. Mikrofluidikler genel olarak mikro seviyeli akışkanların taşınması, kontrollü manipülasyonu ve analizi için kullanılır. Mikro ölçek, makro ölçekle karşılaştırıldığında, düşük örnek ve reaktif hacmi ile maksimum bilgi elde etme, karmaşık protokollerin kullanılmasına olanak sağlama ve hücre mikro ortamının taklit edilmesini sağlama gibi çeşitli avantajları vardır. Mikroakışkan cihazların kimya, fizik, biyoloji, hücre analizi, ilaç keşfi, patojen tespiti, kanser taraması, biyokimya, klinik bilimler, adli bilimler ve biyomedikal araştırmalarda kullanımı yaygınlaşmıştır (Hennessy 2005; Kim ve ark. 2012; Muguruma 2018; Shang ve ark. 2020; Basiri ve ark. 2021).

Dekontaminasyon, bir obje veya yüzeyin hastalık yapan mikroorganizmalardan temizlenerek,

Yazışma adresi / Correspondence: Ahmet Koluman, Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Kınıklı Kampüsü, Pamukkale, Denizli E-posta: akoluman@pau.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-6313-4370 • ²0000-0001-5308-8884

temas etmeye uygun hale getirilmesi için yapılan işlemler bütününe verilen isimdir. Biyolojik kirlenmelerin yönetiminde uygulanan dekontaminasyon, bu-laşmış nesnelerin sağlığa zararlı olamayacak şekilde yeniden kullanılacak kadar temiz olacak şekilde ya da halk sağlığı açısından risk kabul edilen biyosu-çulara ait bulaşıcıların tamamen imha edilmek üzere sterilize ve dezenfekte edilmesidir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) sterilizasyonda, dezenfeksiyonda ve antiseptik biyosid olarak kullanılmaktadır. Renksiz bir sıvıdır. Sporoidal aktivite plazma fazında önemli derecede artmasına karşın, hidrojen peroksitin (% 10-30) yük-sek konsantrasyonları ve daha uzun temas zamanları gereklidir. Hidrojen peroksit serbest hidroksil rad-ikallerini ürettiği için güçlü okside edici bir ajandır. Serbest hidroksil radikallerinin DNA, lipit, protein gibi hücre bileşenlerine bağlandıkları ve özellikle sülfidril grupları ve çift bağları hedef aldıkları bilin-mektedir. Genellikle, % 7,5'lik hidrojen peroksit ile sterilizasyonda 20°C ve 6 saatlik temas süresi, aynı koşullarda dezenfeksiyonda ise 30 dakikalık temas süresi kabul edilmektedir (Rosendale 2002; DeQu-eiroz ve Day 2008; Lineback ve ark. 2018; Wood ve Adrion 2019; Zulauf ve ark. 2020).

Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene in-dirgemesini katalize eden, tetramerik demir porfirin içeren, yüksek molekül ağırlıklı bir antioksidan en-zimdir. Katalaz enzimi pH (4-10) ve sıcaklık (20-50 °C) aralığında aktivite gösterebilmektedir. Aerobik ve pek çok fakültatif anaerobik mikroorganizma katalaz enzimine sahiptir. *Staphylococcus* spp., *Mic-rococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudo-monas* spp. ve *Bacillus* spp. katalaz pozitif mikroor-ganizmlara örnek gösterilebilir (Kirkman ve Gaetani, 2007; Alfonso-Prieto ve ark. 2009; Rios-Castillo ve ark. 2017).

Metot validasyonu terimi bir metodun kullanım amacına uygunluğunun objektif kriterler ile teyit edilmesi olarak tanımlanabilir. Metot validasyonu, genellikle analiz sürelerini kısaltmak amacı ile ge-liştirilen alternatif metotların referans metotlar ile eşdeğer olduğunun teyit edilmesinde kullanılır. Bu kapsamda uluslararası standartlar tarafından belirlenen analizler uygulanarak sonuçlar elde edilir. Bu yapılırken kullanılan altın standart metot ile kıyasla-malar yapılarak elde edilen sonuçlarda yanlış pozitiflik, yanlış negatiflik, spesifite ve sensitivite hesaplan-ması hedeflenir. Böylece geliştirilen yöntemin altın standart yöntem ile uyumu ve kullanılabilirliği ölçül-müş olur. Bu amaçla sonuçların oluşturulmasında iki metot Tablo 1 üzerinde kıyaslanır (Anon 2016a-b; Anon 2017; Anon 2019).

Tablo 1. Validasyon hesaplamalarında kullanılan kıyaslama tablosu.

	Metot 1 Referans sonuç		Toplam	
	Pozitif	Negatif		
Metot 2 Beklenen sonuç	Pozitif	N11	N12	N1-
	Negatif	N21	N22	N2-
Toplam	N-1	N-2	N=N1-+N2- veya N=N-1+N-2	

N11=Her iki metot için pozitif sonuçlar

N12=Metot 1 ile ilgili negatif, Metot 2 ile ilgili pozitif sonuçlar

N21= Metot 1 ile ilgili pozitif, Metot 2 ile ilgili negatif sonuçlar

N22= Her iki metot için negatif sonuçlar

Buradan elde edilen verilerle aşağıda bildirilen hesaplamalar yapılır:

- Sensitivite: Pozitiflerin doğru tespit edildiğini gös-termek için kullanılır. Tabloda N11/N1- şeklinde hesaplanır.
- Spesifite: Negatiflerin doğru tespit edildiğini gös-termek için kullanılır. Tabloda N22/N2- şeklinde hesaplanır.
- Doğruluk: İki metot ile elde edilen sonuçların uyumluluğunu göstermek için kullanılır. Tabloda $(N11+N22)/N$ şeklinde hesaplanır.
- Yanlış Negatiflik Oranı: Pozitif olduğu halde de-ğerlendirilen yöntemle negatif olan sonuçların toplam beklenen pozitif sonuca oranıdır. Tabloda $N12/N1-$ şeklinde hesaplanır.
- Yanlış Pozitiflik Oranı: Negatif olduğu halde de-ğerlendirilen yöntemle pozitif olan sonuçların toplam beklenen negatif sonuca oranıdır. Tablo-da $N22/N2-$ şeklinde hesaplanır.
- Kappa sayısı: İki metodun kıyaslanmasından elde edilen verilerin uygunluğu için kullanılan belir-teç olup ve tablodan $\kappa = [((N11+N22)/N) - ((N1-xN-1) + (N2-xN-2))/N^2] / 1 - ((N1-xN-1) + (N2-xN-2))/N^2$ şeklinde hesaplanır.

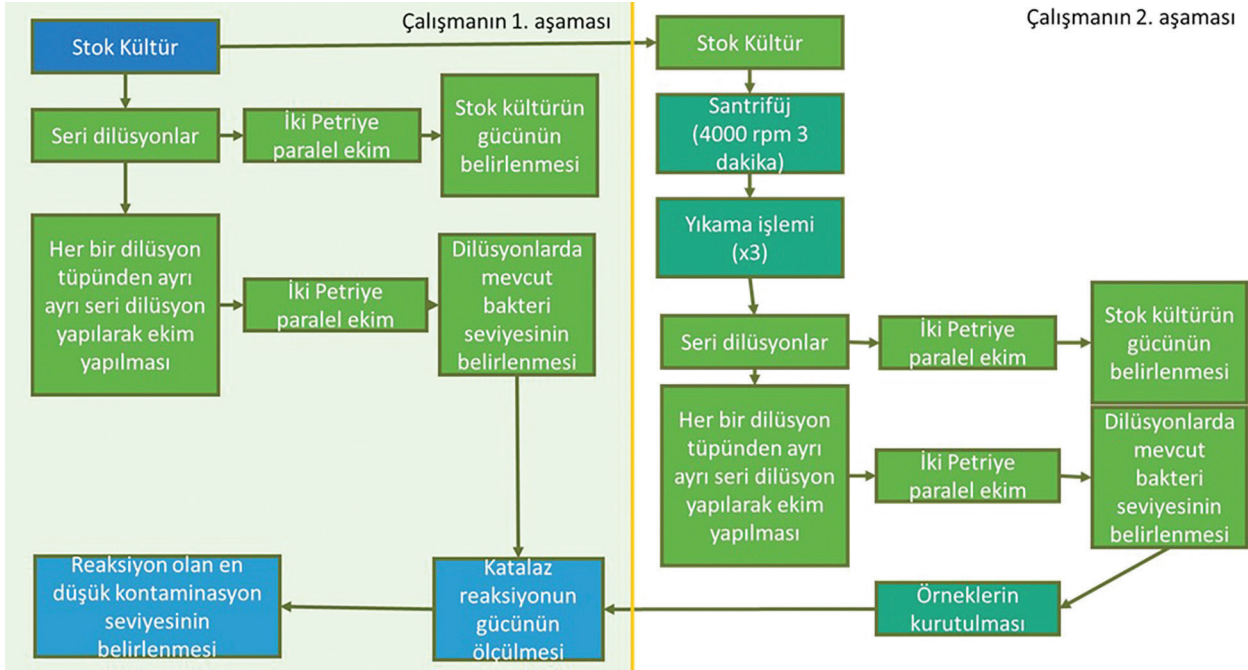
Mikrobiyal Biyosensörlerin validasyon ve verifi-kasyonunda mikrobiyolojik yöntem validasyon ve verifikasyonu uygulanmaktadır (Dushek ve ark. 2014; Goode ve ark. 2014; Anon 2016a-b; Anon 2017; Zutz ve ark. 2017; Anon 2019; Fares ve ark. 2020).

Bu çalışmanın amacı, hidrojen peroksit içeren dekontaminantların etkinliklerini ölçmek için tasar-lanan mikrofluidik katalaz biyosensörü için reaksi-yonun optimizasyonu yapmaktır. Mikrobiyal katalaz aktivitesinin biyosensörlerde kullanımı için gerekli validasyon aşamalarını gerçekleştirip, mikrofluidik yapıya adaptasyon öncesi reaksiyonun doğruluğunu göstermek hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma üç aşamada hazırlanmıştır. İlk aşamada katalaz reaksiyonu optimize edilmiş, ikinci aşamada da

kurutma işlemi yapılarak işlem yeniden tekrar edilmiş ve validasyon yapılmıştır. Üçüncü aşamada da piyasa örnekleri yeni yaklaşım ile kontrol edilmiştir. Çalışmaya ait akış şeması Şekil 1.de gösterilmiştir.



Şekil 1. Çalışmaya ait işlem şeması.

Bakteri kültürü hazırlama

Stok kültür halinde -20°C 'de depolanan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kültürü 9 mL Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid, England) içerisinde pasajlanmıştır. Zenginleştirme 37°C etüvde 24 saatlik üreme için bekletilmiş takiben Baird Parker Agar (BP, Oxoid, England) pasajlanmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tipik koloni morfolojisi oluşana kadar işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Tipik *S. aureus* kolonisinden 1 adet alınarak BHI içerisine pasajlanmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, Almanya) ile seri dilüsyonlar hazırlanarak Plate Count Agar (PCA, Oxoid, England) yüzeyine yayma plak yöntemi ile ekilmiş ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sayımı yapılmıştır. Sayım sonuçları çıkana kadar seri dilüsyonlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Seri dilüsyonlardan her bir tüp ayrı bir örnek olarak kabul edilerek buradan da seri dilüsyonlar yapılarak sayımlar yapılmıştır. Y-bağımlı değişkeni ile X-bağımsız değişkenleri arasındaki doğrusal korelasyon verileri ne düzeyde uyumlu olduğu yanında, regresyon denkleminin eğimiyle de ilgi kurularak (R^2) hesaplanmış ve ölçümlerde sapma belirlenmiştir.

Katalaz reaksiyonu optimizasyonu

Ekim sonuçlarına göre, buzdolabında bir gece bekleyen seri dilüsyonlarda her tüpte bulunan bakteri seviyesi yeniden PCA ile sayılmak üzere ekimler yapılarak 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu dilüsyonlardan vortex ile homojenizasyonu takiben $100\ \mu\text{L}$ temiz bir lam yüzeyine alınmış ve üzerine % 7,5'lük H_2O_2 solüsyonundan $100\ \mu\text{L}$ ile karıştırılmıştır. Köpürme pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Bu aşama üç tekrarlı çalışılmıştır. Toplam her bir dilüsyondan 30 örnekte analiz yapılmıştır.

Kurutmanın katalaz reaksiyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Stok kültür yeniden BHI'ya pasajlanmış ve inkübasyonu takiben $4000\ \text{rpm}$ 'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Takiben dipte kalan kısım yeniden $1000\ \mu\text{L}$ MRD ile sulandırılmış ve santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi toplam 3 kere tekrar edilmiştir. Takiben son kez sulandırılan kültür, vortex ile homojenize edilerek seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan seri ekimler yapılmış aynı zamanda lam yüzeyinde 10 ayrı yere damlatılmıştır. Damla-lar laminar kabin içerisinde oda sıcaklığında kurutulmuş (yaklaşık 30 dakikada kurumuştur) ve kurumayı

takiben hemen % 7,5'lük H₂O₂ eklenerek ölçümler alınmıştır. Kurutmanın etkisinin olup olmadığı bu şekilde belirlenmiştir. Tüm örneklerde köpürmenin olduğu son dilüyon katalaz reaksiyonunun en düşük sınırı kabul edilmiştir. Aynı çalışma *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) ile negatif kontrol olarak tekrar edilmiştir. Tüm analiz aşamaları 3 kere tekrar edilmiştir.

Validasyon

Etkinliği belirlemeyi takiben *S. aureus* stoğundan en düşük katalaz reaksiyonu belirlenen seviyede, orta seviyede ve yüksek seviyede yeniden sulandırma yapılarak lam yüzeyinde 10 ayrı yere damlatılmıştır. Damlalar laminar kabin içerisinde oda sıcaklığında kurutulmuş ve % 7,5'lük H₂O₂ eklenerek 10 kere ölçüm alınmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak *S. mutans* kullanılarak en yüksek seviyede 10 kere aynı ölçümler tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda yanlış pozitiflik, yanlış negatiflik, spesifite ve sensitivite hesaplanmıştır.

Farklı dekontaminantlar ile analiz yönteminin tekrarlanması

İçerisinde 2,87 log₁₀ kob/mL seviyede *S. aureus* bulunan ve laminar kabinde kurutulmuş lamlar önceden hazırlanmıştır. Bu lamlar üzerine piyasada satılan beş farklı ürün konularak reaksiyon hedeflenmiştir. Bu kapsamda piyasadaki elde edilen ürünlerin etkinliği kalitatif olarak ölçülmek istenmiştir. Piyasadaki elde edilen ve analize alınan ürünlerin içerikleri Tablo 2'de bildirilmiştir.

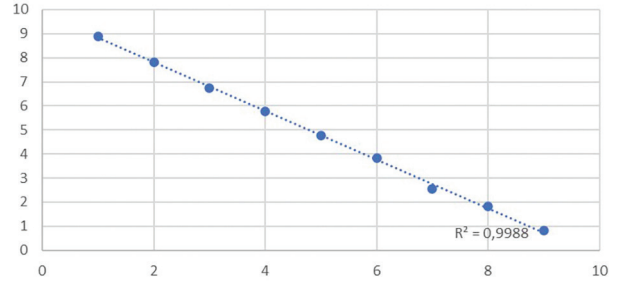
Tablo 2. Çalışmada kullanılan farklı dezenfektanların bileşimleri.

	H2O2	Alkol	Gümüş nanopartikül	Perasetik asit
Dezenfektan A	% 7,5	% 35	-	% 3
Dezenfektan B	% 7,5	-	40nm 200 ppm	-
Dezenfektan C	% 7,5	% 15	-	-
Dezenfektan D	% 14	-	-	-
Dezenfektan E	% 25	-	-	-

Bulgular

Çalışmada kullanılan *S. aureus* suşunun başlangıç kontaminasyon seviyesinin ortalama 8,90 log₁₀ kob/mL olduğu (R²=0,9988) belirlenmiştir. Her bir dilüsyonun gücünün belirlenmesine bağlı olarak elde edilen *S. aureus* dilüsyonlarında toplam canlı bakteri sayımları Şekil 2'de gösterilmiştir.

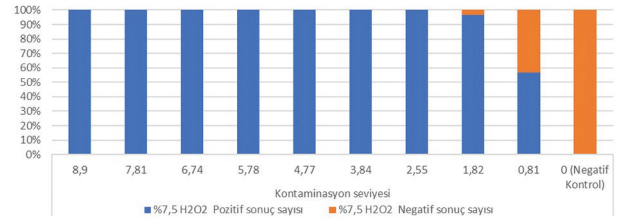
S. aureus seri dilüsyonlarında canlı bakteri sayım sonuçları



Şekil 2. *S. aureus* dilüsyonlarında toplam canlı bakteri sayımları.

Bu dilüsyonlardan yapılan katalaz reaksiyonu sonucunda tamamının pozitif olduğu en düşük bakteri seviyesi belirlenmiştir. Buna göre 30 analizin tamamının pozitif olduğu son seviye 2,55 log₁₀ kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu aşamaya ait veriler Şekil 3'de özetlenmiştir.

S. aureus seviyesine bağlı olarak katalaz reaksiyonu veren dilüsyonlar



Şekil 3. Katalaz reaksiyonu veren minimum dilüsyonların belirlenmesine ait grafik (log₁₀ kob/mL).

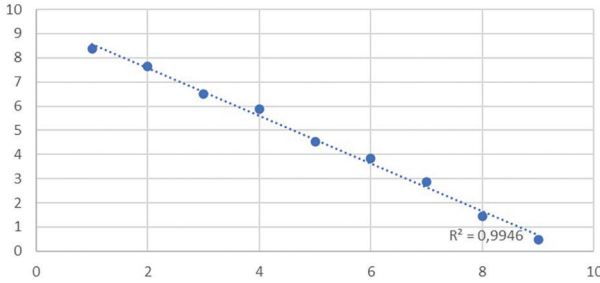
Stok kültürden yeniden pasaj yapılarak elde edilen yeni stokta ilk aşamada uygulanan kontaminasyon seviyesi belirleme işlemi tekrar edilmiştir. Buna göre kurutma aşamasında kullanılacak *S. aureus* suşunun sayısı 8,36 log₁₀ kob/mL olarak (R²=0,9946) belirlenmiştir ve buna ait veriler Şekil 4'de özetlenmiştir. Çalışmada, negatif kontrol olarak *S. mutans* suşu en yüksek seviyeden (8 log₁₀ kob/mL) hazırlanmış ve bir önceki aşamaya benzer şekilde 10 damla lama konularak analiz yapılmıştır.

İlk aşamada yapılan analize benzer şekilde 30 damla örneği kurutulmuş ve bunlarda katalaz reaksiyonu gözlemlenmiştir. Buna göre 30 analizin tamamının pozitif olduğu son seviye 2,87 log₁₀ kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu verilere ait görsel Şekil 5'de sunulmuştur.

Validasyon aşamasında üç farklı seviyede (Düşük=2,87 log₁₀ kob/mL, Orta=3,841 log₁₀ kob/mL,

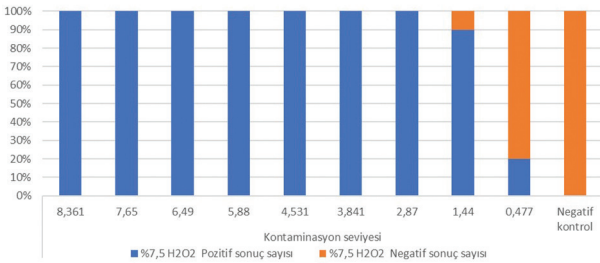
Yüksek= $4,531 \log_{10}$ kob/mL) *S.aureus* 10'ar damla şeklinde hazırlanmış ve kurutulmuştur. Ek olarak negatif kontrol olarak *S.mutans* en yüksek seviyeden (8 \log_{10} kob/mL) hazırlanmış ve 10 damla lama konularak kurutulmuştur. Bu aşamaya ait veriler Tablo 3'de sunulmuştur.

Kurutma öncesi *S.aureus* seri dilüsyonlarında canlı bakteri sayım sonuçları



Şekil 4. Kurutma aşamasında kullanılacak *S.aureus* süşunun gücünün belirlenmesi.

S.aureus seviyesine bağlı olarak katalaz reaksiyonu veren dilüsyonlar



Şekil 5. Katalaz reaksiyonu veren minimum dilüsyonların kurutulmuş örneklerden belirlenmesine ait grafik.

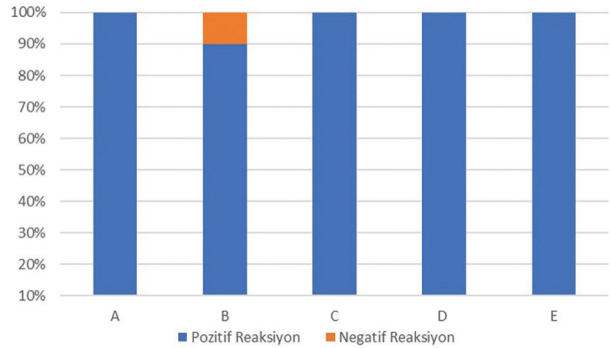
Tablo 3. Validasyon sonuçlarına ait tablo.

	Bilinen sonuç	Toplam		
		Pozitif	Negatif	
Deney sistemi sonucu	Pozitif	29	1	30
	Negatif	0	10	10
Toplam		29	11	40

Analiz yönteminin yanlış pozitiflik (% 0), yanlış negatiflik (% 0,33), sensitivite (% 96), spesifite (% 100), doğruluk (% 97,5) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kurutmanın etkisinin düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Piyasa örneklerinde yapılan analizlerde sadece 1 örnekte negatif sonuç alınmıştır. Bu örnek içerisinde gümüş nanopartikül içermektedir. Piyasa örneklerine ait veriler Şekil 6'da gösterilmiştir.

Ticari örnekler ile elde edilen katalaz reaksiyon sonuçları



Şekil 6. Ticari örneklere ait katalaz reaksiyon sonuçları.

Tartışma ve Sonuç

Katalaz enzimin farklı alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir. Bu kapsamda, süte prezervatif olarak eklenen H_2O_2 giderilmesinde kullanılabilir (Tarhan 1995). Tam aksine kan katalazının seviyesini belirlemede de kullanılan farklı yöntemler mevcuttur (Peimian ve ark. 1996; Mahmoud ve Hadwan 2016). H_2O_2 dekontaminasyon amacıyla yaygın kullanılan bir kimyasaldır. Özellikle tıbbi sterilizasyon için buhar formunda veya plazma halinde kullanımı yaygındır (Volker ve Moirandat 2000). COVID-19 salgınında erişimi sıkıntılı olan N95 maskelerde de, kullanım süresini arttırmak için, H_2O_2 dekontaminasyonu uygulanmıştır (Oral ve ark. 2020). Dekontaminasyonda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, etkinlik ölçümünde, tanımlı standart bir yaklaşım oluşturulamamıştır. Yaklaşımlar daha çok laboratuvarında miktar tespitine yöneliktir (Keisho ve ark. 2018).

Mikrofluidik biyosensörler daha küçük hacimlerde analizi yapmalarına bağlı olarak hem tasarruflu, hem ekonomik hem de taşınabilir seçenekler olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda da mikrofluidik biyosensör tasarımı için ilk aşama olan mikrobiyal optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla mikroorganizmanın tamamı kullanılmıştır. Mikroorganizmanın tamamının kullanıldığı mikrobiyal biyosensörlerde enzimlerin aktivitesi kaybolmamaktadır. Enzim temelli biyosensörler genellikle bir işlem sonrasında ortamda kalan atık ürünlerin kantitatif veya kalitatif ölçümünü hedefleyen sistemlerdir. Katalaz enzimi işlevi gereği hidrojen peroksiti katalizleyen ve ortamda su ve oksijen açığa çıkaran bir enzimdir. Tarım ürünleri başta olmak üzere zararlı mikroorganizmaları veya bunların kalıntılarını tayin etmek için biyosensör uygulamalarında sıkça katalaz enzimi kullanılmaktadır. Benzer bir çalışmada katalaz

enzimi oluşturulan bir biyosensör ile pestisit tayini yapılmıştır (Palüzar ve Özcan 2017). Bakterinin tüm olarak yerleştirildiği mikrobiyal sensörler raf ömrü açısından belirgin bir uzama sağladığı gibi, stabilizasyon ve kullanım açısından da kolaylık sağlamaktadır. Chen ve ark. (2011) *Escherichia coli* ile oksidatif DNA hasarını ölçen bir biyosensör yapmışlardır. Çalışmalarında tüm bakteriyi kullanmanın enzim kullanımından daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada bakterilerin kullanıldığı biyosensörlerin sensitivite ve spesifite açısından seçkin olduklarını vurgulamışlardır (Mitchell ve Gu 2004; Ahn ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012). Bizim çalışmada kullanılan *S.aureus* ile elde edilen sensitivite ve spesifite sonuçlarımız bildirilen çalışmalarla uyum göstermektedir. Mikrobiyal biyosensörlerle yapılan çalışmalarda sonuçların sensitivite ve spesifitenin yüksek olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Hennessy 2005; Kim ve ark. 2012; Muguruma 2018; Shang ve ark. 2020; Basiri ve ark. 2021). Bizim çalışmamızda da elde edilen veriler yanlış pozitiflik (% 0), yanlış negatiflik (% 0,33), sensitivite (% 96), spesifite (% 100), doğruluk (% 97,5) olarak elde edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen veriler literatür ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızın son aşamasında piyasada bulunan beş farklı ürün konularak reaksiyon izlenmiştir. Mikroorganizmanın piyasada bulunan H_2O_2 içeren dezenfektanlardan sadece birinde yapılan bir tekrarda negatif sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Bunun da muhtemel sebebinin bakteri konsantrasyonunda homojenizasyonda bozulma veya stabilizasyon sorunu olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda gümüş nanopartikül hızlı biçimde antimikrobiyal etki göstermektedir. Buna bağlı olarak da negatif sonuç gözlemlenebileceği düşünülmüştür. Goyal ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada virüsler üzerine H_2O_2 içeren dezenfektan buharının etkili olduğunu bildirmiş, ancak bakterilerde uygulanırken katalaz enziminin etkinliği düşürebileceğini bildirmiştir. Özellikle hastanelerde yapılan dezenfeksiyonda H_2O_2 içeren dezenfektanların kullanımının yaygın olduğu ve 4 logaritma azalma tetikledikleri bildirilmiştir. Benzer şekilde bazı durumlarda katalaz pozitif mikroorganizmaların etkinliği düşürebildiği bildirilmiştir (Weber ve ark. 2016). Benzer bir başka çalışmada, Humayun ve ark. (2019), H_2O_2 içeren dezenfektanların fumigasyonunu takiben % 2 oranında hastane odalarında canlı bakteri bulunabildiğini bildirmiştir. Benzer sonuçlar Falagas ve ark. (2011) ve Ali ve ark. (2016) tarafından da bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada H_2O_2 içeren dezenfektan uygulamasını takiben

katalaz aktivitesine bağlı *S.aureus* suşlarının canlı kaldığını bildirmişlerdir.

Biyolojik kirlenmeler birçok ortamda meydana gelebildiği gibi biyosuçlar kapsamında da meydana gelebilir. Bilinen dekontaminantların uygulanmasında kontrol mekanizması mevcut değildir. Kontrol tüm sürecin bitiminde luminensans veya floresans tabanlı takip ile yapılmaktadır. Tarafımızdan mikrobiyal optimizasyonu yapılan sistem dekontaminasyon sırasında ilgili yüzeylere yerleştirilebilecek böylece dekontaminantın ilgili yüzeylere penetrasyonu ve etkinliği ölçülebilecektir. Bu amaçla *S.aureus* bütün olarak yüzeye kurutulularak sabitlenmesinin katalaz reaksiyonu üzerine etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda elde edilen veriler ışığında sistemin güven aralığı yüksek ve hassas bir yapısı olduğu da gözlemlenmiştir. Bundan sonrasında mikrofluidik yapıya yerleştirilecek mikroorganizmanın uygulamalarda etkinliklerine bakılması hedeflenmektedir.

Teşekkür: Bu makale içerisinde yer alan veriler, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yüksek Lisans Projesi desteği alınarak yürütülen 2020FEBE037 kodlu "Hidrojen peroksit dekontaminasyon etkinliğinin belirlenmesine yönelik mikrofluidik katalaz biyosensörü" projesi kapsamında üretilmiştir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Ahn JM, Hwang ET, Youn CH, Banu DL, Kim BC, Niazi JH, Gu MB. Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. *Biosens Bioelectron.* 2009 Dec 15;25(4):767-72. doi: 10.1016/j.bios.2009.08.025.
- Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc.* 2009 Aug 26;131(33):11751-61. doi: 10.1021/ja9018572.
- Alhadrami HA. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnol Appl Biochem.* 2018 May;65(3):497-508. doi: 10.1002/bab.1621. Epub 2017 Nov 23.
- Ali S, Muzslay M, Bruce M, Jeanes A, Moore G, Wilson AP. Efficacy of two hydrogen peroxide vapour aerial decontamination systems for enhanced disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium difficile* in single isolation rooms. *J Hosp Infect.* 2016 May;93(1):70-7. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.016. Epub 2016 Feb 9.
- Anonim (2016a) International Standardization Organization. ISO 16140-2:2019 Microbiology of the food chain - Method validation.
- Anonim (2016b) International Standardization Organization ISO 13485:2016 Medical devices - Quality management systems - Requirements for regulatory purposes
- Anonim (2017) International Standardization Organization ISO 17468:2016 Microbiology of the food chain - Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method

- Anonim (2019) International Standardization Organization ISO/TC 34/SC9 Validation requirements on establishment or revision of a standardized reference method.
- Banerjee P, Kintzios S, Prabhakarandian B. Biotoxin detection using cell-based sensors. *Toxins* (Basel). 2013 Nov 29;5(12):2366-83. doi: 10.3390/toxins5122366.
- Basiri A, Heidari A, Nadi MF, Fallahy MTP, Nezamabadi SS, Sedighi M, Saghazadeh A, Rezaei N. Microfluidic devices for detection of RNA viruses. *Rev Med Virol*. 2021 Jan;31(1):1-11. doi: 10.1002/rmv.2154. Epub 2020 Aug 26.
- Chen Z, Lu M, Zhuang G, Wang H. Enhanced bacterial biosensor for fast and sensitive detection of oxidatively DNA damaging agents. *Anal Chem*. 2011 May 1;83(9):3248-51. doi: 10.1021/ac200426x. Epub 2011 Mar 31.
- Chen Z, Lu M, Zou D, Wang H. An E. coli SOS-EGFP biosensor for fast and sensitive detection of DNA damaging agents. *J Environ Sci (China)*. 2012;24(3):541-9. doi: 10.1016/s1001-0742(11)60722-5.
- DeQueiroz GA, Day DF. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol*. 2007 Oct;103(4):794-802. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03299.x.
- Dushek O, Lellouch AC, Vaux DJ, Shahrezaei V. Biosensor architectures for high-fidelity reporting of cellular signaling. *Biophys J*. 2014 Aug 5;107(3):773-782. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.021.
- Falagas ME, Thomaidis PC, Kotsantis IK, Sgouros K, Samonis G, Karageorgopoulos DE. Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *J Hosp Infect*. 2011 Jul;78(3):171-7. doi: 10.1016/j.jhin.2010.12.006. Epub 2011 Mar 9.
- Fares H, Abbass Y, Valle M, Seminara L. Validation of Screen-Printed Electronic Skin Based on Piezoelectric Polymer Sensors. *Sensors* (Basel). 2020 Feb 20;20(4):1160. doi: 10.3390/s20041160.
- Goode JA, Rushworth JV, Millner PA. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*. 2015 Jun 16;31(23):6267-76. doi: 10.1021/la503533g. Epub 2014 Dec 2.
- Goyal SM, Chander Y, Yezli S, Otter JA. Evaluating the virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour. *J Hosp Infect*. 2014 Apr;86(4):255-9. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.003. Epub 2014 Feb 27
- H. Murguruma, *Biosensors: Enzyme Immobilization Chemistry*, Editor(s): Klaus Wandelt, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier, 2018, Pages 64-71, ISBN 9780128098943, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13486-9>.
- Humayun T, Qureshi A, Al Rowaily SF, Carig J, Humayun F. Efficacy Of Hydrogen Peroxide Fumigation In Improving Disinfection Of Hospital Rooms And Reducing The Number Of Microorganisms. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2019 Oct-Dec;31(Suppl 1)(4):S646-S650.
- K. Yabuta, H.Futamura, K. Kawasaki, M. Hirao, H. Sugiyama, Design-oriented regression models for H2O2 decontamination processes in sterile drug product manufacturing considering rapidity and sterility, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 548, Issue 1, 2018, Pages 466-473, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.055>.
- Kim J, Park HD, Chung S. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*. 2012 Aug 15;17(8):9818-34. doi: 10.3390/molecules17089818.
- Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007 Jan;32(1):44-50. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.003. Epub 2006 Dec 8.
- Knight AW. Using yeast to shed light on DNA damaging toxins and irradiation. *Analyst*. 2004 Oct;129(10):866-9. doi: 10.1039/b404874c.
- Leman Tarhan, Use of immobilised catalase to remove H2O2 used in the sterilisation of milk, *Process Biochemistry*, Volume 30, Issue 7, 1995, Pages 623-628, ISSN 1359-5113, [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00066-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00066-2)
- Lineback CB, Nkemngong CA, Wu ST, Li X, Teska PJ, Oliver HF. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Dec 17;7:154. doi: 10.1186/s13756-018-0447-5.
- Mahmoud H. Hadwan, New Method for Assessment of Serum Catalase Activity, *Indian Journal of Science and Technology*, Vol 9(4), DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i4/80499, January 2016
- Mehrotra P. (2016). Biosensors and their applications - A review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 6(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Mitchell RJ, Gu MB. An *Escherichia coli* biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Mar;64(1):46-52. doi: 10.1007/s00253-003-1418-0. Epub 2003 Aug 23.
- Oral E., K.K. Wannomae, R. Connolly, J. Gardecki, H. M. Leung, O. Muratoglu, A. Griffiths, A. N. Honko, L. E. Avena, L. G. A. McKay, N.Flynn, N. Storm, S.N. Downs, R. Jones, B. Emmal, Vapor H2O2 sterilization as a decontamination method for the reuse of N95 respirators in the COVID-19 emergency medRxiv 2020.04.11.20062026; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.20062026>
- Palúzar H, Özcan HM (). Katalaz Temelli PANI Biyosensörü ile Deltameterinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2017, 21(2), 644-651.
- Peimian Ou, Simon P. Wolff, A discontinuous method for catalase determination at 'near physiological' concentrations of H2O2 and its application to the study of H2O2 fluxes within cells, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Volume 31, Issues 1-2, 1996, Pages 59-67, ISSN 0165-022X, [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(95\)00039-T](https://doi.org/10.1016/0165-022X(95)00039-T).
- Ríos-Castillo AG, González-Rivas F, Rodríguez-Jerez JJ. Bactericidal Efficacy of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on Stainless Steel Surfaces. *J Food Sci*. 2017 Oct;82(10):2351-2356. doi: 10.1111/1750-3841.13790. Epub 2017 Aug 23.
- Rosendal ME. Decontamination strategies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002 Mar;32(2):311-21, v. doi: 10.1016/s0195-5616(01)00007-9.
- Shang Y, Sun J, Ye Y, Zhang J, Zhang Y, Sun X. Loop-mediated isothermal amplification-based microfluidic chip for pathogen detection. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(2):201-224. doi: 10.1080/10408398.2018.1518897. Epub 2018 Dec 20.
- Stupak EÉ, Stupak IV. [Cyclic digene system as a control element of a bacterial biosensor]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2012 Jan-Feb;48(1):18-22. Russian.
- Volker Sigwarth, Claude Moirandat Development and Quantification of H2O2 Decontamination Cycles, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* Jul 2000, 54 (4) 286-304
- Weber DJ, Kanamori H, Rutala WA. 'No touch' technologies for environmental decontamination: focus on ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems. *Curr Opin Infect Dis*. 2016 Aug;29(4):424-31. doi: 10.1097/QCO.0000000000000284.
- William Hennessy, CHAPTER 10 - Flow and Level Sensors, Editor(s): Jon S. Wilson, *Sensor Technology Handbook*, Newnes, 2005, Pages 237-254, ISBN 9780750677295, <https://doi.org/10.1016/B978-075067729-5/50050-1>.
- Wood JP, Adrion AC. Review of Decontamination Techniques for the Inactivation of *Bacillus anthracis* and Other Spore-Forming Bacteria Associated with Building or Outdoor Materials. *Environ Sci Technol*. 2019 Apr 16;53(8):4045-4062. doi: 10.1021/acs.est.8b05274. Epub 2019 Apr 2.
- Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Jan;73(6):1251-8. doi: 10.1007/s00253-006-0718-6. Epub 2006 Nov 17.
- Young H. Lee, Raj Mutharasan, CHAPTER 6 - Biosensors, Editor(s): Jon S. Wilson, *Sensor Technology Handbook*, Newnes, 2005, Pages 161-180, ISBN 9780750677295, <https://doi.org/10.1016/B978-075067729-5/50046-X>.
- Zulauf KE, Green AB, Nguyen Ba AN, Jagdish T, Reif D, Seeley R, Dale A, Kirby JE. Microwave-Generated Steam Decontamination of N95 Respirators Utilizing Universally Accessible Materials. *mBio*. 2020 Jun 25;11(3):e00997-20. doi: 10.1128/mBio.00997-20.
- Zutz C, Wagener K, Yankova D, Eder S, Möstl E, Drillich M, Rychli K, Wagner M, Strauss J. A robust high-throughput fungal biosensor assay for the detection of estrogen activity. *Steroids*. 2017 Oct;126:57-65. doi: 10.1016/j.steroids.2017.07.005. Epub 2017 Jul 14.



Sağlıklı ve ishallerli köpeklerde Genogrup I Picobirnavirusların tespiti ve moleküler karakterizasyonu

İlke Karayel Hacıoğlu¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 14.09.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 11.10.2021

Özet: Picobirnaviruslar (PBV) ilk olarak 1988'de insan ve sıçanların dışkı örneklerinde tespit edilmelerinden bu yana ishallerli ya da asemptomatik diğer kara ve deniz memelilerinde, kuşlarda, omurgasızlarda ve ayrıca çevresel su örneklerinde rapor edilmiştir. Buna karşın, köpeklerde, PBV tespiti ve moleküler epidemiyolojisi hakkında sadece birkaç çalışma vardır. Bu çalışmada, klinik olarak ishal semptomu olan ve sağlıklı görünen 0-6 ay yaş arasındaki yavru köpeklere ait toplam 75 adet dışkı örneğinde PBV'lerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla örnekler, genogrup I (GGI) PBV'nin RdRp genini hedefleyen primerler kullanılarak RT-PCR uygulanmış ve test edilen örneklerin dört tanesi (%5.33) GGI PBV yönünden pozitif bulunmuştur. Bu örneklerden biri (CB1) ishallerli bir köpekten, diğer üç örnek (KB19, KB29, KB30) ise klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerden elde edilmiştir. Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa ishallerli ve klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerde PBV varlığı ve moleküler karakterizasyonu ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Genogrup I, köpek, moleküler karakterizasyon, Picobirnavirus.

Detection and molecular characterization of Genogroup I Picobirnaviruses in dogs

Abstract: Picobirnaviruses (PBVs) have been reported in other terrestrial and marine mammals with or without diarrhea, birds, invertebrates, as well as environmental aquatic samples with diarrhea or asymptomatic since they were first detected in stool samples from humans and rats in 1988. However, in dogs, there are only a few reports of PBV detection and its molecular epidemiology. In this study, it was aimed to detect and molecular characterization of PBVs in a total of 75 stool samples obtained from puppies aged 0-6 months with diarrhea and clinically healthy. For this purpose, the RT-PCR was performed by using primers targeting the RdRp gene of genogroup I (GGI) PBV, and four of the tested samples (5.33%) were found positive for GGI PBV. One of these samples (CB1) was obtained from a dog with diarrhea, and the other three samples (KB19, KB29, KB30) were obtained from clinically healthy dogs. In this study, the presence and molecular characterization of PBV in dogs with diarrhea and clinically healthy appearance were revealed for the first time in our country.

Keywords: Genogroup I, dog, molecular characterization, Picobirnavirus.

Giriş

Picobirnaviruslar (PBV), *Picobirnaviridae* ailesinde yer alan, 35 nm çapında, 60 simetrik dimerden oluşan basit bir ikosaedral kapside sahip, küçük, zarfsız viruslardır (Delmas ve ark. 2019; Ghosh and Malik, 2021). Genomları, iki segmentli çift sarmallı RNA'dan (dsRNA) oluşmaktadır. Büyük genom segmenti (segment 1) 2.3 ila 2.6 kb boyutundadır ve kapsid proteini ile birlikte fonksiyonu henüz bilinmeyen bir polipeptidi kodlamaktadır (Delmas ve ark. 2019). Küçük genom segmenti (segment 2) (1.5-1.9 kb) viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlar. RdRp gen bölgesinin dizilerine dayanarak, PBV'ler genogrup I (GGI) (prototip suşu, 1-CHN-97), genogrup II (GGII) (prototip suşu, 4-GA-91) ve genogrup III (GGIII) olmak üzere üç genogruba ayrılır (ICTV, 2020).

PBV'ler ilk olarak 1988'de insan ve sıçanların dışkı örneklerinde tespit edilmelerinden bu yana (Pereira ve ark. 1988, 1989), diğer kara ve deniz memelilerinde, kuşlarda, omurgasızlarda ve çevresel su örneklerinde rapor edilmiştir (Symonds ve ark. 2009; Ganesh ve ark. 2014; Kashnikov ve ark. 2020). PBV'ler çoğunlukla ishallerli insan ve hayvanlarda tespit edilmiş olsa da, klinik olarak sağlıklı insan ve hayvanlardaki varlığı da rapor edilmiştir (Fregolente ve ark. 2009; Malik ve ark. 2014; Kleymann ve ark. 2020). Bu nedenle, PBV'ler genel olarak fırsatçı enteropatojen olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda memelilerin solunum yollarında PBV'lerin tespiti ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Woo ve ark. 2019; Huaman ve ark. 2021).

Bugüne kadar, PBV'lerin gerçek konakları ve coğrafi dağılımları tam olarak aydınlatılmamıştır

(Joyceyn ve ark, 2020; Ghosh ve Malik, 2021). PBV'ler çeşitli türlerde tespit edilmesine karşın, köpeklerde PBV tespiti ve moleküler epidemiyolojisi hakkında sadece birkaç çalışma bulunmaktadır (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017). Bu çalışmada, klinik olarak ishal semptomları olan ve sağlıklı görünen 0-6 ay yaş arasındaki yavru köpeklerden PBV'lerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, daha önce laboratuvara gönderilen, klinik olarak ishal semptomları olan (n=45) ve sağlıklı görünen (n=30) 0-6 ay yaş arasındaki yavru köpeklere ait toplam 75 adet dışkı örneği kullanıldı. Örnekler, ishallerde köpeklerden klinik semptomların başlamasından sonraki yedi gün içinde alındı.

Viral RNA ekstraksiyonu TRIzol® LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, 10296-028) kullanılarak gerçekleştirildi. Viral RNA'nın denatürasyonunu (95°C'de 5 dk sonrasında 4°C'de 1 dk) takiben, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Köpek dışkı örneklerinde GGI PBV'yi tespit etmek amacıyla PCR testi uygulandı. Bu amaçla RdRp geninin 201 bp'lik bir parçasını hedefleyen PicoB25 ve PicoB43 primerleri (Rosen ve ark. 2000) kullanıldı. PCR protokolü, 95°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonunu takiben toplam 40 siklus olmak üzere, denatürasyon aşaması 95 °C'de 1 dk, annealing aşaması 50°C'de 1 dk, uzama aşaması 72°C'de 1 dk ve son uzama aşaması 72°C'de 7 dk olan ısı döngüsünden oluştu. PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri SafeView™ Classic (ABM, Canada) ile hazırlanan %1'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV ışığı altında gözlemlendi. Elde edilen PCR ürünleri, amplifikasyon için kullanılanlar ile aynı primerler kullanılarak çift yönde sekanslandı. Farklı PBV RdRp genini temsil eden referans diziler, BLAST motoru aracılığıyla GenBank veri tabanından alındı. Elde edilen dizinler Aliview (Larsson, 2014) ve MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation) yazılımı (Edgar, 2004) kullanılarak GenBankasından elde edilen referans virüsler ve referans olmayan diğer ülkelerden bildirilen yerel virüslerin genom dizileri ile hizalandı.

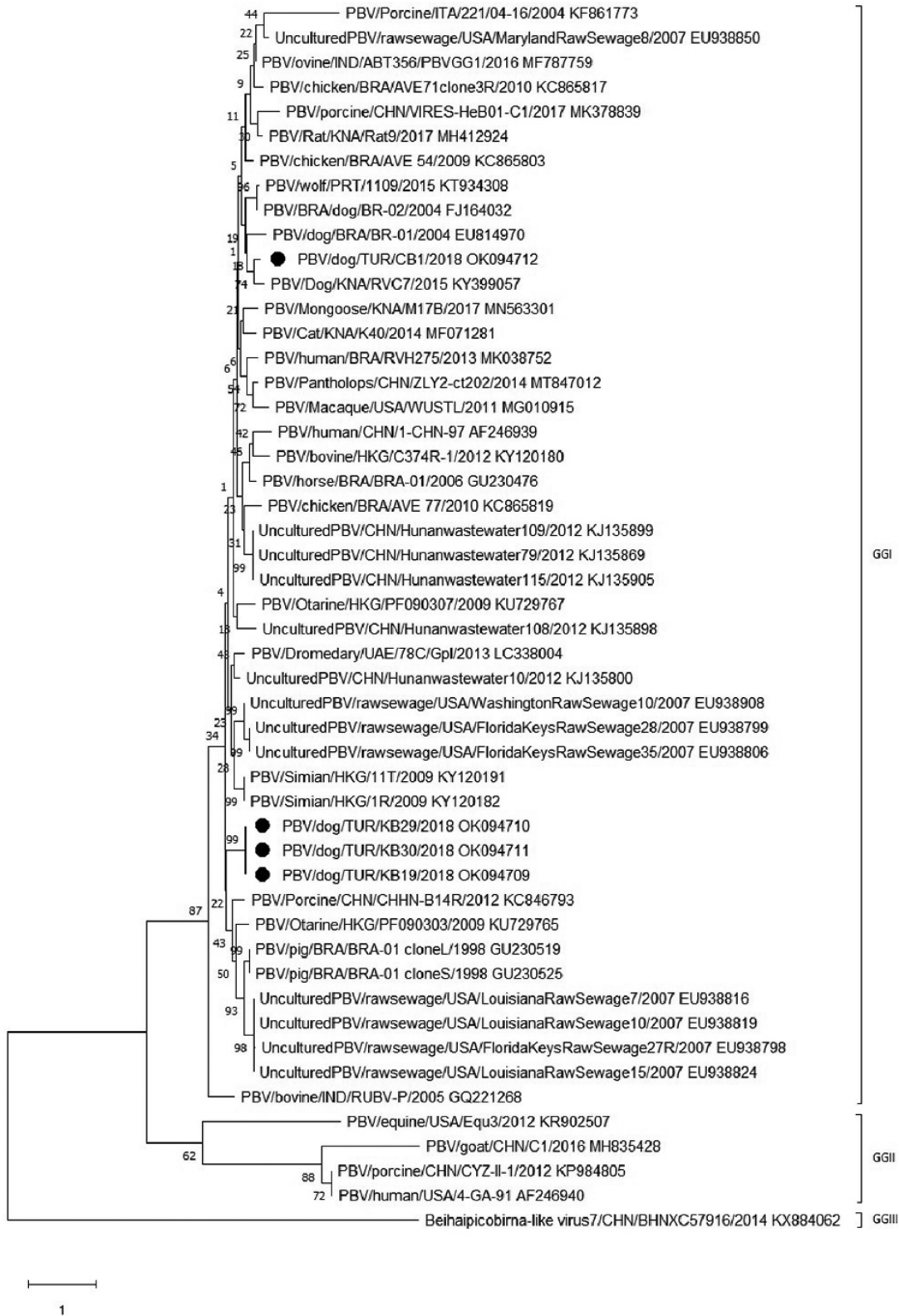
Diğer ülkelerde tespit edilen virüsler ile bu çalışmada elde edilen virüsler arasındaki genetik yakınlık düzeyinin ortaya konulması amacıyla nükleik asit dizinleri üzerinden gerçekleştirilen filogenetik analiz için MEGAX (Kumar ve ark. 2018) programı kullanıldı. Filogenetik ağaç, Maximum-likelihood metoduna göre Tamura3+G modeli kullanılarak inşa edildi ve bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Nükleotid (nt) ve amino asit (aa) benzerlikleri, SIAS çevrimiçi aracı (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) kullanılarak hesaplandı.

Bulgular

Test edilen toplam 75 dışkı örneğinin dört tanesi (%5.33) PBV yönünden pozitif bulundu. Bu örneklerden biri (CB1) ishallerde bir köpeğe, diğer üç örnek (KB19, KB29, KB30) ise klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklere aitti. İshallerde ve sağlıklı görünümlü köpeklerde GGI PBV pozitiflik oranı sırasıyla %2.2 ve %10 bulundu.

Filogenetik ağaçtaki yerleşimleri (Şekil 1) incelendiğinde CB1'in köpek PBV suşları (PBV/dog/BR-01/BRA/2004, PBV/dog/BR-02/BRA/2004 ve PBV/Dog/KNA/RVC7/2015) ve kurt PBV suşu (PBV/wolf/PRT/1109/2015) ile aynı dalda yer aldığı gözlemlendi. Buna karşın KB19, KB29 ve KB30 virüslerinin ise birlikte tek bir dalda yer aldığı ve domuz PBV suşlarının yanı sıra çoğunlukla kanalizasyon sularında tespit edilen PBV suşlarıyla birlikte kümelenildiği tespit edildi.

RdRp gen bölgesinin kısmi dizininin moleküler analizi, dört köpekten saptanan virüslerin birbiriyle %66.66-100 nt ve %71.21-100 aa benzerliği gösterdiğini ortaya koydu. Bu analiz iki köpekten (K29 ve K30) saptanan virüslerin nt dizinlerinin birbirleriyle aynı olduğunu, bir diğerinin (K19) ise bu ikisinden yalnızca bir nt farklı bir dizine sahip olduğunu gösterdi. Dolayısıyla nt ve aa benzerlikleri, bu üç virus ile CB1 arasında en düşük düzeydeydi (sırasıyla %66.66 ve %71.21). Bu çalışmada saptanan virüslerin GGI'in referans suşu 1-CHN-97 ile olan nt ve aa benzerlik oranları sırasıyla %66.1-67.6 ve %60.6-65.1; GGI'de yer alan diğer suşlar ile olan nt ve aa benzerlik oranları ise sırasıyla %55.2-81 ve %45.5-84.8 olarak tespit edildi.



Şekil 1. RdRp gen bölgesinin kısmi uzunluktaki nükleotid dizilerine (201 bp) dayanılarak yapılan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Maximum-likelihood metoduna göre Tamura3+G modeli kullanılarak inşa edildi ve bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Bu çalışmada tespit edilen PBV'ler siyah noktalarla belirtildi.

Tartışma ve Sonuç

PBV birçok evcil ve yaban hayvan türlerinden alınan dışkı örneklerinde tespit edilmiştir (Fregolente ve ark. 2009; Chen ve ark. 2014; Malik ve ark. 2018; Joycelyn ve ark. 2020; Teng ve ark. 2021). Bununla birlikte, bugüne kadar, PBV'nin köpeklerdeki tespitlerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017) bildirilmiş olup bunlardan yalnızca ikisi (Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017) moleküler karakterizasyonlarına ilişkindir. Bu çalışmada ülkemizde ilk defa ishallerde ve klinik olarak sağlıklı yavru köpeklerde PBV'nin tespiti ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

PBV'ler sıklıkla ishallerde insan ve hayvanlarda tek başlarına ya da diğer patojenlerle birlikte saptanmalarına rağmen (Ganesh ve ark. 2014), asemptomatik vakalarda da sıklıkla tespit edilmektedir (Fregolente ve ark. 2009; Malik ve ark. 2014; Kleymann ve ark. 2020). Bu nedenle PBV'nin gastroenteritis enfeksiyonlarındaki rolleri tam olarak açıklanamamakta ve genel olarak fırsatçı enteropatojen olarak tanımlanmaktadır (Kashnikov ve ark. 2020; Ghosh ve Malik, 2021). Köpeklere ilişkin daha önce yapılan çalışmalarda bu ajanların varlığının hem ishallerde hem de asemptomatik örneklerde tespit edildiği bildirilmiştir (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017). Brezilya'da yapılan iki çalışmanın birinde ishallerde köpeklerde %1.8 oranında PBV saptanırken (Costa ve ark. 2004), diğer çalışma asemptomatik köpeklerde gerçekleştirilmiş ve %0.86 oranında pozitiflik bulunmuştur (Fregolente ve ark. 2009). St. Kitts'de yapılan diğer çalışmada ise ishallerde köpeklerde %2.3 oranında pozitiflik bulunmuştur (Navarro ve ark. 2017). Bu çalışmada ishallerde ve klinik olarak sağlıklı görünümde köpeklerde saptanan PBV pozitiflik oranları sırasıyla %2.2 ve %10; örneklenen popülasyon için ise %5.3 olarak bulunmuştur. Sağlıklı görünümde köpeklerdeki pozitiflik oranının (%10) hem köpeklerle ilgili bildirimlere (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017) hem de bu çalışmada ishallerde köpeklerde saptanan orana göre oldukça yüksek olması, filogenetik ağaçtaki yerleşimleri de dikkate alındığında, konakçı-çevre etkileşiminin olası etkisini akla getirmektedir.

Elde edilen PBV'lerin moleküler karakterizasyonu, tümünün GGI'de yer aldığını göstermektedir. Tek bir nt farkı haricinde özdeş bulunan üç PBV'nin (KB19, KB29 ve KB30), aynı yerde yaşayan köpeklerden elde edilmiş olması, enfeksiyonun sirküle olan tek bir virustan kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu üç virus ile CB1 arasındaki nt ve aa benzerlikleri sırasıyla %66.66 ve %71.21 olarak hesaplanmıştır.

Filogenetik analize bakıldığında ise ishallerde köpekten elde edilen CB1 ile klinik olarak sağlıklı görünümde köpeklerden elde edilen virusların (KB19, KB29 ve KB30) ayrı dallarda kümelendikleri gözlenmiştir. CB1 virusu, PBV/Dog/KNA/RVC7/2015 suşu ile en yakın olmak üzere, diğer köpek PBV suşları (dog/BR-01/BRA/2004, dog/BR-02/BRA/2004) ve kurt PBV suşu (PBV/wolf/PRT/1109/2015) ile birlikte aynı dalda yer almıştır (Şekil 1). Buna karşın KB19, KB29 ve KB30 virusları domuz PBV suşlarının yanı sıra çoğunlukla kanalizasyon sularında tespit edilen PBV suşlarıyla birlikte kümelenebilir. Filogenetik ağaç ve benzerlik oranları, GGI PBV suşları arasında gözlenen yüksek düzeyde genetik çeşitliliği doğrular niteliktedir (Wang ve ark. 2012; Woo ve ark. 2016; Navarro ve ark. 2017; Navarro ve ark. 2018). Filogenetik olarak PBV için türe özgü kümelenebilir modelleri şimdiki kadar gözlemlenmemiştir (Woo ve ark. 2016; Delmas ve ark. 2019; Ghosh ve Malik, 2021). Bununla birlikte, sekans ve filogenetik analize dayalı olarak, bu çalışmaların birçoğunda insan dahil türler arası geçiş olabileceği belirtilmesine rağmen bu durum kesinlik kazanmamıştır (Ganesh ve ark. 2011, 2014; Wang ve ark. 2012; Joycelyn ve ark. 2020). Önceki çalışmalar, insan, domuz ve simian PBV'leri arasındaki yakınlığı bildirmiştir (Bányai ve ark. 2008; Wang ve ark. 2012; Chen ve ark. 2014; Joycelyn ve ark. 2020). Ayrıca Amerika'da atık su numuneleri üzerinde yapılan bir çalışma, GGI PBV RNA'sının kanalizasyon suyu numunelerinin %100'ünde ve arıtılmış atık su numunelerinin de %33'ünde tespit edildiğini göstermiştir (Symonds ve ark. 2009). Wang ve ark. (2012), aynı ortamda farklı konakçı türlerde yakın ilişkili PBV ile oluşan enfeksiyonların nasıl edinildiğini su kaynaklı bir PBV enfeksiyonu ile açıklayabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da tespit edilen virusların moleküler analizinde en yakın olarak kanalizasyon sularında tespit edilen PBV'lerin yanı sıra farklı türlerde saptanan PBV'ler ile de yakın olması türler arası geçişe dair önermeleri akla getirmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde ilk defa ishallerde ve klinik olarak sağlıklı görünümde köpeklerde PBV varlığı ortaya konulmuştur. Köpeklerde PBV hakkında veri eksikliği, türler arası geçiş ve PBV'lerin zoonotik potansiyeli hakkında son bilgiler göz önüne alındığında, PBV'lerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu hakkında daha fazla çalışma yapılması önemlidir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir ve deney hayvanları etik kurulu iznine gerektirir.

Kaynaklar

- Bányai K, Martella V, Bogdán Á, Forgách P, Jakab F, Meleg E, Bíró H, Melegh B, Szucs G, (2008) Genogroup I picobirnaviruses in pigs: Evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J. Gen. Virol.* 89, 534–539. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83134-0>
- Chen M, Sun H, Lan D, Hua X, Cui L, Yuan C, Yang Z. (2014) Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China. *Virus Genes* 48, 553–556. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1058-8>
- Costa AP, Cubel Garcia RCN, Labarthe NV, Leite JPG (2004) Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 56, 554–557. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000400020>
- Delmas B, Attoui H, Ghosh S, Malik YS, Mundt E, Vakharia VN. (2019) Ictv virus taxonomy profile: Picobirnaviridae. *J. Gen. Virol.* 100, 133–134. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001186>
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fregolente MCD, de Castro-Dias E, Martins SS, Spilki FR, Allegretti SM, Gatti MSV. (2009) Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Res.* 143, 134–136. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.006>
- Ganesh B, Masachessi G, Mladenova Z. (2014) Animal Picobirnavirus. *VirusDisease* 25, 223–238. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0207-y>
- Ganesh B, Nataraju S, Pativada M, Kumar R, Banyai K, Masachessi G, Mladenova Z, Nagashima S, Ghosh S, Kobayashi N. (2011) Genogroup I picobirnavirus in diarrhoeic foals: Can the horse serve as a natural reservoir for human infection? *Vet. Res.* 42, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-5>
- Ghosh S, Malik YS. (2021) The True Host/s of Picobirnaviruses. *Front. Vet. Sci.* 7, 6–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.615293>
- Huaman JL, Pacioni C, Sarker S, Doyle M, Forsyth DM, Pople A, Hampton JO, Carvalho TG, Helbig KJ. (2021) Molecular Epidemiology and Characterization of Picobirnavirus in Wild Deer and Cattle from Australia: Evidence of Genogroup I and II in the Upper Respiratory Tract. *Viruses* 13, 1492. <https://doi.org/10.3390/v13081492>
- ICTV. (2020) Picobirnaviridae Erişim adresi: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsrna-viruses/w/picobirnaviridae, Erişim tarihi: 01.09.2021.
- Joycelyn SJ, Ng A, Kleymann A, Malik YS, Kobayashi N, Ghosh S. (2020) High detection rates and genetic diversity of picobirnaviruses (PBVs) in pigs on St. Kitts Island: Identification of a porcine PBV strain closely related to simian and human PBVs. *Infect. Genet. Evol.* 84, 104383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104383>
- Kashnikov AY, Epifanova NV, Novikova NA. (2020) Picobirnaviruses: Prevalence, genetic diversity, detection methods. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii* 24, 661–672. <https://doi.org/10.18699/VJ20.660>
- Kleymann A, Becker AAMJ, Malik YS, Kobayashi N, Ghosh S. (2020) Detection and molecular characterization of picobirnaviruses (PBVs) in the mongoose: Identification of a novel PBV using an alternative genetic code. *Viruses* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3390/v12010099>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Larsson A. (2014) AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Malik YS, Kumar N, Sharma K, Dhama K, Shabbir MZ, Ganesh B, Kobayashi N, Banyai K. (2014) Epidemiology, Phylogeny, and Evolution of Emerging Enteric Picobirnaviruses of Animal Origin and Their Relationship to Human Strains. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/780752>
- Malik YS, Sircar S, Saurabh S, Kattoor JJ, Singh R, Ganesh B, Ghosh S, Dhama K, Singh RK. (2018) Epidemiologic Status of Picobirnavirus in India, A Less Explored Viral Disease. *Open Virol. J.* 12, 99–109. <https://doi.org/10.2174/1874357901812010099>
- Navarro J de O, Candido M, de Almeida-Queiroz SR, Buzinaro M da G, Livonesi MC, Fernandes AM, de Sousa RLM. (2018) Genetic diversity of bovine Picobirnavirus, Brazil. *Virus Genes* 54, 724–728. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1586-8>
- Navarro R, Yibin C, Nair R, Peda A, Aung MS, Ketzis J, Malik YS, Kobayashi N, Ghosh S. (2017) Molecular characterization of complete genomic segment-2 of picobirnavirus strains detected in a cat and a dog. *Infect. Genet. Evol.* 54, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.006>
- Pereira HG, Araújo HP de, Fialho AM, Castro L de, Monteiro SP. (1989) A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 137–140. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000100025>
- Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JMS, Andrade ZP. (1988) Novel Viruses in Human Faeces. *Lancet* 332, 103–104. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90032-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90032-3)
- Rosen BI, Fang ZY, Glass RI, Monroe SS. (2000) Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology* 277, 316–329. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0594>
- Symonds EM, Griffin DW, Breitbart M. (2009) Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>
- Teng JLL, Wernery U, Wong PC, Chan E, Lee HH, Joseph S, Bai R, Tang Y, Wong EYM, Lau SKP, Woo PCY (2021) High Prevalence of Genogroup I and Genogroup II Picobirnaviruses in Dromedary Camels. *Viruses* 13, 430. <https://doi.org/10.3390/v13030430>
- Wang Y, Banyai K, Tu X, Jiang B. (2012) Simian genogroup I picobirnaviruses: Prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2779–2782. <https://doi.org/10.1128/JCM.00634-12>
- Woo PCY, Teng JLL, Bai R, Tang Y, Wong AYP, Li KSM, Lam CSF, Fan RYY, Lau SKP, Yuen K. (2019) Novel Picobirnaviruses in Respiratory and Alimentary Tracts of Cattle and Monkeys with Large Intra- and Inter-Host Diversity. *Viruses* 11, 574. <https://doi.org/10.3390/v11060574>
- Woo PCY, Teng JLL, Bai R, Wong AYP, Martelli P, Hui SW, Tsang AKL, Lau CCY, Ahmed SS, Yip CCY, Choi GKY, Li KSM, Lam CSF, Lau SKP, Yuen KY. (2016) High diversity of genogroup I picobirnaviruses in mammals. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01886>



Türkiye’de sığır tüberkülozu enfeksiyonun epidemiyolojik sorunları ve çözüm analizi

Şahin Çakır¹ , Kadir Serdar Diker² 

¹ Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı Gıda ve Yem Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara, Türkiye.

² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 06.07.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 30.09.2021

Özet: Sığır Tüberkülozu (bTB) Türkiye’de sığır sürülerinde endemik bir seyir izlemektedir. Bugüne kadar, hastalıkla mücadele amacıyla yürütülen çalışmalardan çeşitli nedenlerden dolayı istenen sonuç elde edilememiştir. Sığır Tüberkülozu mihrak sayıları son yıllarda artmaya devam etmektedir. Bu süreç, ülkemiz hayvan sağlığı ve halk sağlığı için risk artışı, damızlık hayvan kaybını ve sosyo ekonomik kaybı beraberinde getirmektedir. Bu çalışmayla ülkesel olarak sahada bu artışın nedeni olan sorunlar epidemiyolojik olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca tespit edilen sorunların elde edilen bilgiler ışığında çözüm analizi yapıp öneriler sunularak, mevcut ulusal mücadele stratejisinin geliştirilmesine katkı sağlanması ve hastalıkla mücadelede politika oluşturma sürecine rehberlik edilmesi amaçlanmıştır. Sığır Tüberkülozu hastalığının doğası ve Türkiye’nin şartları düşünüldüğünde hastalık prevalansının azaltılması için mücadelenin zorlu ve maliyetli olacağı anlaşılmaktadır. Bu çalışma sonucunda, sadece bu işe odaklanacak bir veteriner hizmetleri teşkilat yapısının yeniden oluşturulup, tüm paydaşlarla birlikte uzun sürede ve sabırla yürütülecek bir çalışmayla hastalığın prevalansı azaltılıp, kademeli ari bölgeler oluşturularak başarıya ulaşılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Çözüm analizi, epidemiyoloji, *Mycobacterium bovis*, sığır tüberkülozu, sorun analizi

Epidemiological problems and solution analysis of bovine tuberculosis infection in Turkey

Abstract: Bovine Tuberculosis (bTB) has an endemic course in cattle herds in Turkey. Until today, the expected results have not been achieved due to various reasons from the studies carried out to fight the disease. The number of Bovine Tuberculosis outbreaks has continued to increase in recent years. This process brings an increase in risk for animal health and public health, loss of breeding animals, and socio-economic loss in our country. In this study, the problems that caused this increase in the field nationally were tried to be determined epidemiologically. In addition, it is aimed to contribute to the development of the current national control strategy and to guide the policy-making process in the fight against the disease by making solutions analyses and presenting suggestions in the light of the obtained information. Considering the nature of Bovine Tuberculosis disease and the conditions of Turkey, it is understood that the fight to reduce the prevalence of the disease will be difficult and costly. As a result of this study, it has been concluded that a veterinary services organizational structure that will focus only on this work will be reformed, and success will be achieved by reducing the prevalence of the disease and creating progressive free zones with a long-term and patient work with all stakeholders.

Keywords: Solution analysis, epidemiology, *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, problem analysis

Giriş

Sığır Tüberkülozu (bTB) sığırların önemli bir hastalığı olmanın yanı sıra halk sağlığını etkileyen önemli bir zoonoz hastalıktır (Claridge ve ark. 2012; Bezos ve ark. 2014). Ayrıca insanlar, evcil ve yabani hayvanlar da dahil olmak üzere geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir (Rossi ve ark. 2015). bTB birçok ülkede hayvan ve insan sağlığı için önemli derecede sorun oluşturmaktadır (Hassan ve ark. 2014). bTB hayvanların sağlığı ve refahıyla birlikte çok sayıda insanın hem sağlığını hem de ekonomisini olumsuz yönde etkile-

meye devam etmektedir. Bu kapsamda bu zoonotik hastalığın önlenmesi ve kontrol altına alınması için hayvan, insan ve çevre sağlığını birbirine bağlayan “Tek Sağlık” şemsiyesi altında sektörler arası ve çok disiplinli bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır (Olea-Poppelka ve ark. 2017).

Resmi rakamlara göre dünya çapında 50 milyondan fazla sığırın *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) ile enfekte olduğu ve bTB’nin yıllık 3 milyar \$’dan fazla tarımsal kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (Pandey ve ark. 2016). Ancak gerçek sayıların

bunun çok üstünde olduğunu varsaymak zor değildir. bTB'nin endemik olduğu ülkelerde hastalık nedeniyle oluşan ekonomik kayıplar, sığır ihracatına uygulanan uluslararası kısıtlamalarla daha da artmaktadır (Claridge ve ark. 2012). Hastalık dünyanın en savunmasız uluslarında milyonlarca kişinin yaşamında yıkıcı etkiye sahip olabilir (Michel ve ark. 2010). Son olarak 2016 yılında Avrupa Birliği ve Türkiye tarafından yürütülen "Veteriner Hizmetleri Strateji Belgesinin Hazırlanması için Teknik Yardım Projesi"nde Türkiye'de bTB, sığır popülasyonunda endemik ve kronik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Hastalığın prevalansına dair resmi bilgilere göre bTB hastalığına ilişkin ekonomik kayıplar yıllık 78 Milyon TL (~1 Milyon \$) olarak hesaplanmıştır (Viviani ve ark. 2016). Ancak son yıllarda mihrak sayılarında önemli bir artış gözlemlenmektedir. Türkiye'de bTB hastalığı mihraklarının artmasına etki eden sahadaki risk faktörlerinin epidemiyolojik olarak tespitinin, mücadele stratejilerinin oluşturulması için gerekli olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmayla, ülkesel olarak yürütülen anket çalışmaları ve mahallinde yürütülen epidemiyolojik saha araştırması sonucunda tespit edilen sorunlara, elde edilen bilgiler ışığında çözüm önerileri sunulacak olarak mevcut ulusal mücadele stratejisinin geliştirilmesine katkı sağlanması ve hastalıkla mücadelede politika oluşturma sürecine rehberlik edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Veri tabanlarının incelenmesi

Yürütmüş olduğumuz ülkesel proje ve doktora tez çalışması kapsamında 2013-2019 yılları arasındaki bTB mihrak sayıları Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü-Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi (OIE-WAHIS)'den alınarak yıllar ve aylar itibarıyla analizi yapılmıştır. 01.01.2017-06.03.2020 tarihleri arasında Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB), Veteriner Bilgi Sistemi (VET-BİS)'nde görülen aktif bTB mihrakları incelenmiştir. Saha epidemiyolojik araştırması için tesadüfi yöntemle belirlenen bTB mihrağı işletmelerin son bir yıllık hayvan hareketleri TOB, Hayvan Kayıt Sistemi (TÜRKVET)'nden alınmıştır. Bu işletmelere giriş ve çıkış yapan hayvanların hareketleri sorgulanmıştır.

Anketlerin hazırlanması ve örnekleme

Anketler bTB hastalık mihraklarının sahada takibini yapan Resmi Veteriner Hekimler (RVH) ve işletmesinde bTB hastalığı belirlenen yetiştiricilere uygulamak üzere iki kategoride özgün olarak hazırlanmıştır. Sahada ön denemesi yapılan anketlerin uygulama-

nabilir olduğuna karar verilmiş, daha kolay veri elde edilmesi amacıyla elektronik ortama aktarılmış ve bağlantı (<https://docs.google.com/forms>) verilerek İl/İlçe Tarım ve Orman Müdürlükleri (İTOM)'nin çevrimiçi veri girişine açılmıştır. Katılımcılara vereceği cevapların gizlilik kurallarına uyularak sadece bilimsel amaçlarla kullanılacağı, anketlere ad-soyadı yazmak zorunda olmadığı, vereceği yanıtların anonim olarak değerlendirileceği, ankete katılmayabileceği veya istemediği zaman devam etmeyebileceği anketin açıklama metninde bildirilmiştir.

Türkiye'deki RVH anketinin hedef popülasyonu, TOB'un 81 ilde İTOM'larında hayvan hastalıklarıyla mücadelede görev yapan ve Bakanlığın VETBİS'ten erişim sağlanarak alınan 6.543 RVH'dir. Bu sayı esas alınarak anket yapılacak RVH'lerin sayısı 2 kademeli tesadüfi örnekleme yöntemine göre belirlenmiştir. Anket yapılacak RVH'lerin seçiminde dikkate alınan kriterler 1. kademede her bir ilde görevli RVH sayısı, 2. kademede ise bu illerde 01.01.2017-06.03.2020 tarihleri arasında çıkan aktif bTB mihrak sayısıdır. %95 Güven Aralığı (CI) ve %5 hata payı dikkate alınarak iller bazında anket yapılacak RVH sayısı 363 olarak hesaplanmıştır. Türkiye geneli 72 ilden, 371 RVH'in ankete verdiği cevaplar değerlendirmeye alınmıştır.

Yetiştirici anketinin hedef popülasyonu Türkiye'deki büyükbaş hayvan yetiştiricileridir. Anketin hedef popülasyon sayısının kaynağı ise VETBİS'dir. Anket yapılacak yetiştirici sayısı 01.01.2017-06.03.2020 tarihleri arasında çıkan, aktif 752 bTB mihrağının bulunduğu 66 ilde, 2 kademeli tesadüfi örnekleme yöntemine göre belirlenmiştir. Anket yapılacak yetiştiricilerin seçiminde dikkate alınan kriterler 1. kademede bTB mihrağının bulunduğu ilçeler, 2. kademede ise bu ilçelerde mihrak çıkan köylerdir. Söz konusu tarihler arasında tespit edilen 752 mihraktan %95 CI ve %5 hata payı dikkate alınarak anket yapılacak yetiştiricilerin sayısı 255 olarak hesaplanmıştır. Türkiye geneli belirlenen illerden 59, diğer illerden 2 olmak üzere toplamda 61 ilden, 317 yetiştiricinin ankete vermiş olduğu cevaplar değerlendirilmiştir.

Epidemiyolojik saha araştırması

Epidemiyolojik saha araştırması için Türkiye'nin 7 bölgesinden 14 il, belirlenen her ilden de 2 yerleşim yeri (yedekli) seçilerek toplamda 28 yerleşim yeri belirlenmiştir. Belirlenen 26 asil, 2 yedek işletme olmak üzere toplamda 28 yerleşim yerinde mihrak işletmeler ve bu işletmelerde hastalığı takip eden RVH'ler mahallinde ziyaret edilmiştir. Yerleşim yerlerinin seçimi coğrafi bölge, ildeki bTB mihrak yoğunluğu, ulaşılabilirlik, proje bütçesi vb. kriterler göz

önünde bulundurulması tesadüfi yöntemle yapılmıştır. Bu yerleşim yerinde ziyaret edilecek mihrak işletmenin belirlenmesinde TOB'un, VETBİS ve TÜRKVET kayıtları göz önünde bulundurulmuştur. Hastalığın takibini yapan RVH'ler ve işletmesinde hastalık çıkan yetiştiricilerin bTB hastalığı hakkındaki değerlendirmeleri alınmış ve yerinde gözlem yapılmıştır.

Bulgular

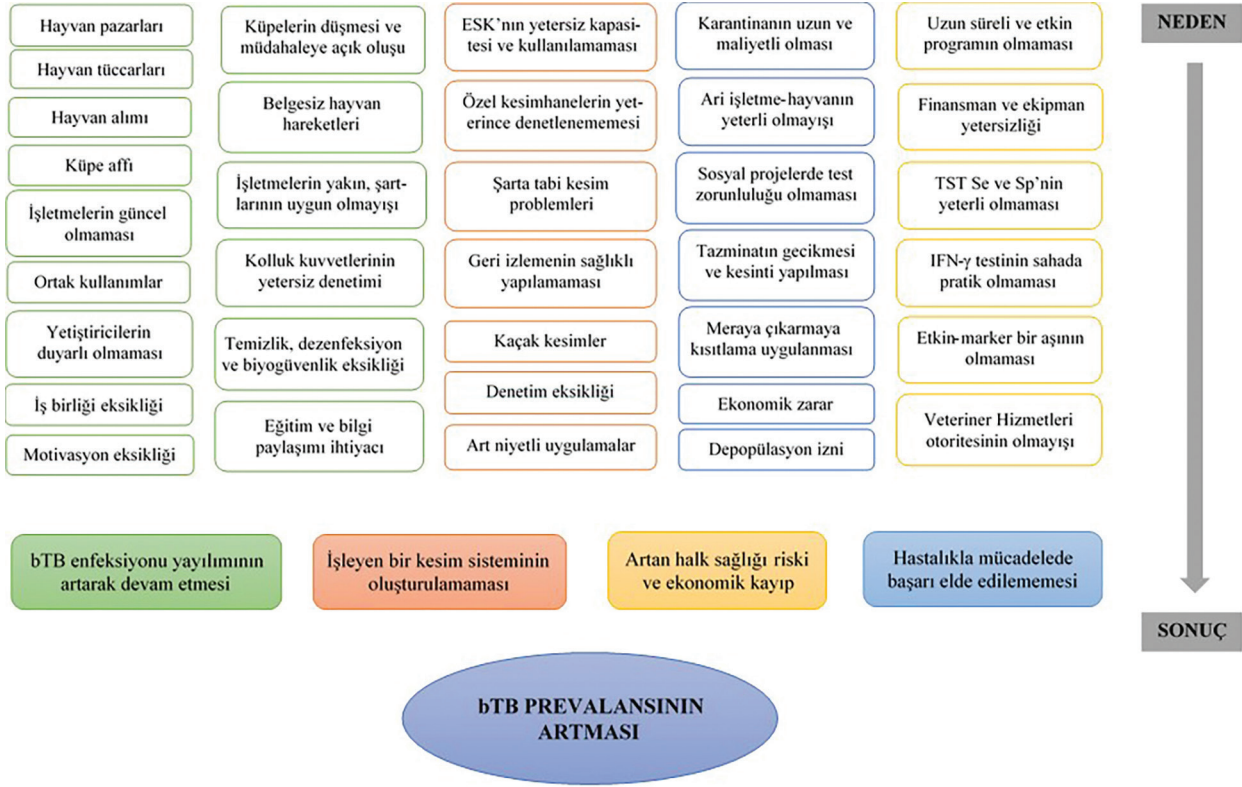
OIE-WAHIS ve TOB, VETBİS-TÜRKVET veri tabanlarından alınan raporlar, literatür okuması, RVH ve yetiştirici anketlerinden elde edilen veriler, yürütülen epidemiyolojik saha çalışmalarından derlenen RVH ve yetiştirici görüşleri ile mahallinde yapılan gözlemlere dayanarak Türkiye'deki bTB enfeksiyonun epidemiyolojisinde rol oynayan temel dinamikler sorun analizi ve çözüm analizi yapılarak iki başlık altında sunulmuştur.

bTB enfeksiyonun epidemiyolojik sorun analizi

- Bugüne kadar hastalıkla mücadelede ilgili tüm paydaşların katılımıyla devlet politikası olarak uzun süreli ve etkin bir mücadele programının uygulanamadığı,
- Yürütülen mevcut hastalıkla mücadele programının uygulanmasında iller/ilçeler arasında konuya duyarlılık bakımından farklı uygulamalar yapıldığı,
- Bugüne kadar uygulanan mücadele programlarına yeterli ve sürdürülebilir finansman desteğinin sağlanamadığı,
- Belgesiz hayvan hareketlerinin ve alım-satımının önlenemediği, bu konuda ilgili tüm kurumlarla birlikte hareket edilemediği, çeşitli nedenlerden dolayı ceza yaptırımlarının uygulanamadığı,
- Kasaplık hayvanların nakilleri için ayrı bir uygulama yapılmadığı,
- Kolluk kuvvetlerinin yol kontrolleri, hayvan pazarları ve karantina uygulanan işletmelerdeki denetimleri yeterince yapmadığı,
- Hayvan tüccarlarının hayvan alım-satımlarını genellikle belgesiz ve kayıtsız yaparak bTB'nin bulaşmasındaki ana faktörlerinden birini oluşturduğu,
- Ülke genelinde hayvan pazarlarının kurulmasına yönelik bir planlama yapılmadığı ve bazı yerleşim yerlerinde hayvan pazarı olmadığı,
- Çalışma iznli hayvan pazarlarında hayvanların pazara giriş-çıkışlarında belgelerinin gerektiği şekilde kontrol edilmediği ve sağlık kontrollerinin yeterince yapılmadığı,

- Hayvanların kimliklendirme araçlarına (küpe, pasaport vb.) yetkisiz kişi ve kuruluşlarca art niyetli manipülasyonlar yapıldığı,
- Damızlık ve sütçü işletmelerde bTB'nin daha sık görülmesi, hayvanların daha uzun süre kalması nedenleriyle kayıt ve kimliklendirmede daha fazla problem yaşandığı,
- Kayıt sistemlerinin yaşı büyük hayvanların kaydına açılması nedeniyle problem yaşandığı ve yetiştiricilerde alışkanlık oluşturduğu,
- bTB çıkan işletmelerin kayıtlarının genellikle güncel olmadığı ve bu konuda personelin zorluk yaşadığı,
- bTB şüpheli hayvanların tanı testlerine müdahale edildiği, bu hayvanların gayri resmi yollarla test ettirilip el altından pazarlanabildiği,
- Hayvancılık işletmelerinin genellikle birbirlerine yakın hatta bitişik olduğu, hayvan barınağı olarak inşa edilmemiş alanlarda ve küçük ölçekli işletmelerde hayvan sağlığı ve refahı açısından uygun olmayan koşulların reenfeksiyon kaynağı oluşturduğu,
- Genç neslin sosyal nedenlerden dolayı hayvancılık yapmak istememesi nedeniyle hayvancılık işletmelerinin iyileştirmesi için uzun vadeli projelerin uygulanamadığı,
- İl ve ilçelerde meskûn mahalde bulunan eski işletmelerin yenilenmesine izin verilmediği için hayvan sağlığı ve refahı yönünden koşullarının uygun olmadığı,
- İşletmelerde ve hastalığın bulaşmasında risk teşkil eden diğer yerlerde temizlik ve dezenfeksiyonu da kapsayan biyogüvenlik uygulamalarının genellikle yetersiz olduğu,
- İşletmeler arasındaki mera, su kaynağı, boğa, sağım ünitesi vb. ortak kullanım alanlarının bTB'nin yayılımını artırdığı,
- Kesimhaneye girişte kesilecek hayvanların küpe ve belgelerinin tam olarak kontrol edilmediği ve kayıtların sağlıklı tutulmadığı, bTB tespit edilen hayvanların geldiği işletmenin ve orijin işletmelerinin (6 ayağa kadar) geri izlemesinin doğru bir şekilde yapılmadığı,
- Et ve Süt Kurumu (ESK) kombinalarının şarta tabi kesim kapasitesinin yetersiz olması nedeniyle talebi karşılayamadığı,
- bTB tespit edilen hayvanları ivedilikle kesime gönderecek bir sistemin bugüne kadar kurulmadığı ve bTB pozitif hayvanların nakliyesinin karşılanmadığı,

- ESK'nın fiyatının düşük ve ödeme süresinin uzun olması nedenleriyle yetiştiricilerin nakliye karşılayan, yüksek fiyattan hızlı kesim yapan ve bedelini kısa sürede ödeyen özel kesimhane ve kavurma yerlerini tercih ettiği ancak bu yerlerin denetimlerinin yetersiz olduğu ve halk sağlığı açısından risk teşkil ettiği,
- İTOM'lar tarafından kavurma bedeli ödemesiyle ilgili yürütülen işlemlerin zaman kaybı, iş yükü, sorumluluk, tazminat ödemesinin gecikmesi vb. durumlara neden olduğu,
- Tüm bTB vakalarının %90'dan fazlasının kesimhanelerde tespit edildiği ancak burada görevli RVH'lerin görevlerini çeşitli nedenlerle sağlıklı bir şekilde yürütemediği,
- Kaçak kesimler ile kurbanlık kesimlerin muayene ve denetimlerinin etkin bir şekilde yapılamadığı,
- Görev yapan personelle denetimi yapan personelin aynı olması, güvenliğin ve uygun çalışma ortamının sağlanamaması gibi nedenlerle denetimlerin etkin bir şekilde yapılamadığı,
- Kesimhanede ve kurbanlık kesimler sonrası yapılan postmortem muayenede bTB'nin %1-2 oranında bulunduğu ancak Tüberkülin Deri Testi (TST) ile yapılacak bir taramada bu oranın çok daha yüksek olacağını öngörüldüğü,
- Hastalık çıkan işletmede, hastalığın tespitinden sönüşüne kadar şarta tabi kesime gönderilen veya ölen hayvanların oranın %35-55 aralığında olduğu,
- TST'nin sensitivite (Se) ve spesifitesi (Sp)'nin yeterli olmadığı, interferon gama (IFN- γ) testinin numunelerin laboratuvara ulaştırma süresi kısıtlamasından (8 saat içerisinde) dolayı sahaya yönelik kullanımının pratik olmadığı ve anerjik hayvanların tespitinde sorun yaşandığı,
- Hastalıkla mücadelede kullanılacak iyi bağışıklık sağlarken tanı testlerine müdahale etmeyen bir aşının hala geliştirilememiş olduğu ve TST'ni karıştırmaya rağmen popülasyonda hastalık sıklığını düşürecek yeterlilikteki aşının kullanım alternatiflerinin bugüne kadar gündeme gelmediği,
- Tazminat ödemelerinin gecikmesi, karantina sürecinin uzun olması ve meraya çıkarmaya kısıtlama getirilmesi, yetiştiricilerin yeterince duyarlı olmaması gibi nedenlerle hastalık şüpheli olguların bildirimlerinin zamanında veya hiç yapılmadığı,
- Karantina süresine bağlı olarak hastalığın çıktığı işletmenin ekonomisine yaşattığı kayıplar (süt, et, ölüm-kesim, damızlık, yavru vb.) nedeniyle zarar verdiği ve bazen bu durumun ailenin geçimini dahi etkilediği,
- bTB'nin işletmelere bulaşmasının büyük oranda dışarıdan enfekte hayvan alımından kaynaklandığı,
- Sosyal projelerden dağıtılan hayvanlar için test uygulama zorunluluğunun olmaması nedeniyle sağlıklı damızlık hayvan dağıtılmadığı ve bTB yayılımını artıran bu durumun yetiştiricilerin mağduriyetine neden olduğu,
- Ari işletme sayısının ve ari işletmelerdeki toplam damızlık hayvan sayısının yetersiz olduğu, fiyatlarının yüksek ve temininin güç olduğu,
- Ari işletmelere yakın yerlerde ari olmayan işletme kurulmasına izin verildiği ve ari işletmeler ile ari olmayan işletmelerin ortak alanları kullandığı,
- İşletmelere hastalıktan arilik durumuna göre yönetmelikte yer almasına rağmen bir gruplandırma yapılmadığı, ari bölgelere hayvan hareketleri öncesi ve sonrasında herhangi test uygulama zorunluluğu getirilmediği,
- Yetiştiricilerin kesim talebi dışında RVH tarafından mihrak işletmedeki bTB pozitif hayvan sayısı oranına göre depopülasyon kararı almasına izin verilmediği ve karkasların değerlendirilmesine yönelik bir düzenleme bulunmadığı,
- Hastalıkla mücadele çalışmalarına paydaş kurumlar olan Sağlık Bakanlığı ve İçişleri Bakanlığı'ndan yeterince destek alınamadığı,
- Mevcut Veteriner Hizmetleri teşkilat yapısının hastalıklarla mücadele çalışmalarına odaklanmaya uygun olmadığı,
- Tüm ülkede Tüberküloz ihtisas enstitüsü, insan kaynağı, laboratuvar altyapısı ve tüberkülin üretiminin sınırlı olduğu,
- Veteriner Kontrol Enstitülerinin rutin faaliyetleri (kontrol hizmeti, aşı üretimi, izleme programları, eğitim vb.) çok fazla olması nedeniyle araştırma faaliyetlerine yeteri kadar zaman ayıramadığı,
- Uzun süren mücadele çalışmalardan sonuç alınmamasının personelde motivasyon kaybına neden olduğu, uzmanlaşma, eğitim ve karşılıklı bilgi paylaşımına ihtiyaç duyulduğu,
- Bazı teşkilatlarda personel, araç, ekipman eksikliklerinin olduğu,
- Hastalığın doğası gereği klinik belirti göstermeden seyretmesi ve diğer hastalıklara kıyasla mücadele için araçlarımızın az sayıda olduğu müta laa edilmiştir.



Şekil 1. bTB enfeksiyonunun epidemiyolojik sorun analizi

bTB enfeksiyonunun epidemiyolojik çözüm analizi

- Hastalıkla mücadelede başarılı olan ülke örnekleri incelenip, ülkenin finansman kaynakları ve kendine özgün şartları göz önünde bulundurularak uzun süreli ve sürdürülebilir bir mücadele programının oluşturulması,
- bTB ile mücadele programının ilgili tüm paydaşların katılımıyla, coğrafi alan ve şartları uygun olan bölgelerden başlanarak etkin ve ülkesel olarak bir örnek şekilde uygulanması,
- bTB hastalığıyla mücadele için uygulanacak kontrol ve eradikasyon programına devlet politikası oluşturularak kesintisiz yeterli finansman desteğinin sağlanması,
- Her geçen gün artan, yeterince kontrol edilemeyen, hastalığın yayılmasında önemli rolü olan belgesiz hayvan hareketlerinin ve alım-satımın mevzuatı gereği bu konuda sorumluluğu bulunan ilgili tüm kurumlarla birlikte hareket edilerek tamamıyla kontrol altına alınması, bu konudaki cezai yaptırımların uygulanabilir kılınması,
- Kasaplık olarak sevk edilecek hayvanların canlı nakledilmeyip, bulunduğu şehirlerdeki kesimha-

- nelerde kesilerek gideceği yere frigorifik araçlarla karkas olarak nakledilmesi,
- Kolluk kuvvetlerinin yol kontrolleri, hayvan pazarları ve karantina uygulanan işletmelerdeki denetimlerini arttırması,
- Hayvan tüccarlarının kayıt altına alınması, sayılarına kısıtlama getirilmesi, eğitim verilmesi, araçlarının coğrafi konum sistemi ile takip edilmesi ve bütün alım-satımlarını belgeli yapması için yaptırım uygulanması da dahil gerekli olan her türlü tedbirin alınması,
- Ülke genelinde yeniden bir planlama yapılarak araç muayene istasyonları benzeri bir modelle, bölgenin potansiyeline göre hayvan pazarlarının kurulmasına izin verilmesi, izinsiz kurulan hayvan pazarlarının kapatılması, izinli olanların plana göre yeniden gözden geçirilmesi ve hayvan borsası, güvenli sanal hayvan pazarı, dijital pazar gibi bulaş kaynağı oluşturmayan yeni alım-satım yöntemlerinin geliştirilmesi,
- Hayvanların pazara giriş-çıkışlarında küpe ve belgelerin mutlaka kontrol edilmesi ve sorumlu Veteriner Hekimlerce yapılacak muayene ve denetimlerde hastalık şüphesi görülen hayvanların

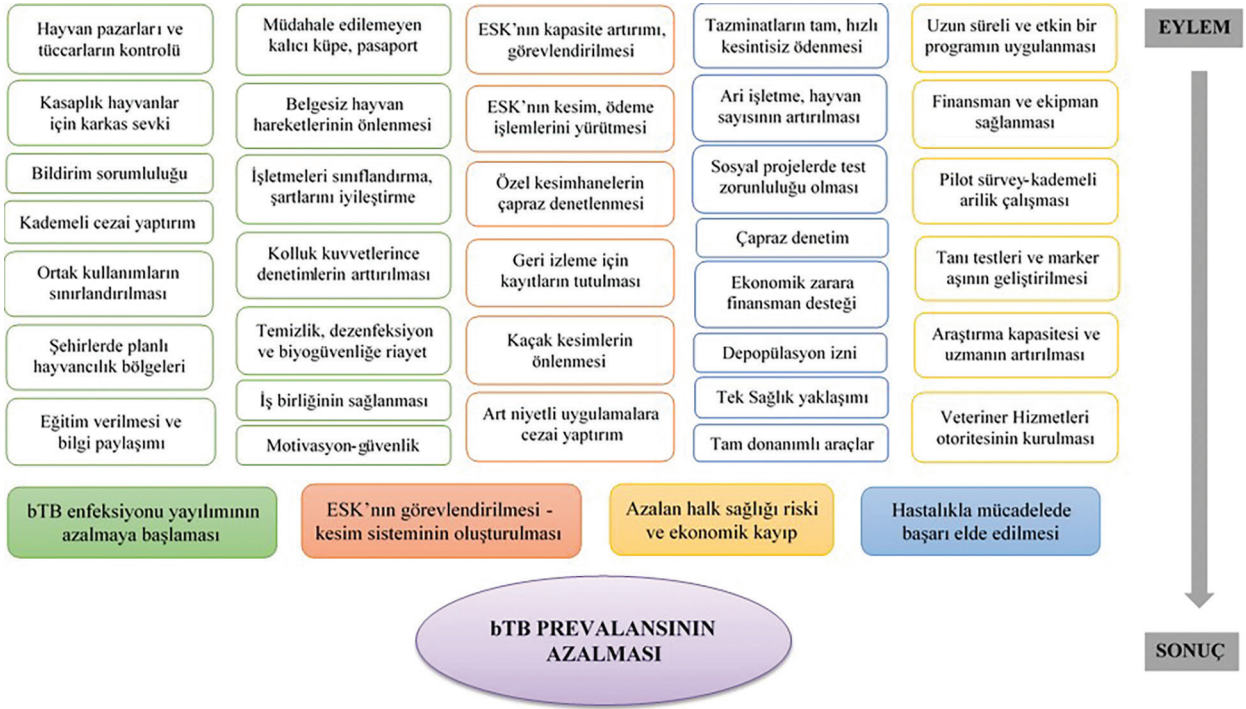
- satışına izin verilmeyerek gerekli işlemler için İTOM'a bildirim yapılması,
- Sığır cinsi hayvanların kimliklendirme araçlarının kalıcı, dijital, dışarıdan müdahale edilemeyen özellikte ve sahada kullanımının kolay olması,
 - Kalıcı kayıt ve kimliklendirme uygulamasının özellikle damızlık ve sütçü işletmelerde zorunlu hale getirilmesi,
 - Kayıt sistemlerinin yaşı büyük hayvanların kaydına açılması uygulamasından vazgeçilerek bunun yerine yetiştiriciye böyle bir fırsat bırakılmadan bilgilendirme yapılarak veya cüzi miktarda cezai yaptırım uygulayarak bildirim yapma sorumluluğu kazandıracak adımların atılması,
 - RVH'lerce yapılan sağlık taraması, küpelerin ve kayıtların incelenmesi sonucunda herhangi bir problem olmaması halinde güncel olmayan işletme kayıtları için tutanak hazırlanması ve duruma göre kademeli bir cezai yaptırım uygulayarak güncelleme yapılabilmesi,
 - Hastalıklarla mücadele sürecini etkileyen her türlü art niyetli girişime gerekli cezai yaptırımın uygulanması ve tazminat ödenmemesi,
 - Öncelikle hayvancılık işletmelerinde hayvan sağlığı ve refahı yönünden olması gereken asgari şartların belirlenerek bir sınıflandırma yapılması, birinci sınıfta yer alacak işletmelere kendi Veteriner Hekimlerini istihdam etme ya da sözleşme yapma zorunluluğu getirilmesi, gerekliyse diğer sınıflarda yer alan işletmelere bir plan dahilinde TOB'ca devlet destekli kredi sağlanarak konumu uygun olmayanların başka yere taşınması ve şartlarının iyileştirilmesi,
 - Geçimini hayvancılıktan sağlayan ailelerin genç nesilleri hayvancılık yapacaksa taahhüt alınarak sosyal güvenlik desteği, yaşam alanı desteği, çocukları için eğitim desteği, işletme kapasitesinin artırılması için uzun vadeli finansman desteği gibi destekler verilip, işletmesinin şartları iyileştirilerek yetiştiriciliğe devam etmesinin sağlanması,
 - İl ve ilçelerde meskûn mahalde bulunan hayvan sağlığı ve refahı yönünden şartları uygun olmayan işletmelerin iskâna açılmayacak uzak bölgelerde kurulacak planlı işletmelere taşınması,
 - İşletmelerde ve hastalığın bulaşmasında risk teşkil eden diğer yerlerde temizlik, dezenfeksiyon ve biyogüvenlik önlemlerine uyulması,
 - İşletmeler arasında bTB hastalığının yayılmasını en aza indirmek için mümkün olduğunca mera, su kaynağı, boğa, sağım ünitesi vb. ortak kullanım alanlarının sınırlandırılması,
 - Kesimhanede hastalık tespit edilen hayvanların geldiği işletmenin ve orijin işletmelerinin geri izlemesinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için kesimhane girişinde kesilecek hayvanların küpe ve belgelerinin tam olarak kontrol edilmesi, kesim kayıtlarının sağlıklı tutulması ve tutmayanlar hakkında gerekli cezai yaptırımların uygulanması,
 - Halk sağlığı önceliklendirilerek kamu adına görev yapan ESK'nın kapasitesinin artırılması veya şartları uygun olan kesimhanelerle ESK'nın denetiminde olmak şartıyla ESK adına sözleşme yapılması,
 - Bakanlık Makamı tarafından ihbari mecburi hastalık tespiti nedeniyle şarta tabi olarak kesilecek hayvanların ivedilikle kesime gönderileceği bir sistemin kurulması için ESK'ya mevzuatla kamu görevi verilmesi, kuruma personel ve çeşitli sınıflarda hayvan nakliye araçları alınarak RVH tarafından o ilden sorumlu ESK kesimhanesine kesilecek hayvanların bilgileri verildikten sonra mümkün olan en kısa sürede bir kesim programı oluşturarak kuruma ait nakliye araçlarıyla işletmelerinden bu hayvanların tutanakla teslim alınması,
 - Kavrurma bedeli ödeme uygulamasından vazgeçilerek şarta tabi kesimlerin eksiklikler giderilerek ESK'ca yapılması, halk sağlığı açısından risk teşkil ettiği için özel kesimhaneler ve kavrurma yerlerinde şarta tabi hayvanların kesimine izin verilmemesi ve bu yerlerin çapraz denetime tabi tutulması,
 - İTOM'larca tazminatlardan kavrurma bedeli düşme uygulamasından vazgeçilerek tazminatı bTB için mevzutta belirlenen oran üzerinden hazırlanması, yetiştiriciye ödemenin bu rakam üzerinden yapılması, şarta tabi hayvanların kesiminden elde edilen kavrurma ve etin ESK'ca pazarlanması, buradan elde edilecek kazançtan her türlü operasyon bedeli ve belirlenecek miktarda kar payı düşüldükten sonra kalan kısmın tazminat ödemelerinin sürdürülebilirliğinin sağlanması için tazminat ödemelerinde kullanmak üzere ilgili ödeme bütçesine aktarılması,
 - bTB'nin tespiti ve halk sağlığı açısından kesimhanelerin önemine binaen buralara yeterli sayıda RVH görevlendirilmesi, güvenliklerinin sağlanarak uygun mesleki çalışma ortamının oluşturulması, ante/postmortem muayenesinin etkin bir şekilde yapılması ve hastalık lezyonu görülen karkasların tamamının bildirimini sağlanması,

- Bakanlık tarafından gerekli tedbirler alınarak kaçak kesimler ile kurbanlık kesimlerin muayene ve denetimlerinin etkin bir şekilde yapılması,
- Kesimhanelerde ve hayvan pazarlarında görevlendirilen personelin görevlerini sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için uygun ortam oluşturulması, güvenlik desteği sağlanması ve denetimlerin çapraz olarak yapılması,
- bTB ile mücadele için planlanacak çalışma öncesi sahanın gerçek durumunun öğrenilmesi için pilot bir survey çalışması yapılması,
- bTB mihrak işletmelerdeki şarta tabi kesime gönderilme oranı göz önünde bulundurularak yapılacak survey çalışması sonrasında tahmini bütçe hesaplaması yapılarak pilot olarak köy, ilçe, il veya bölge olarak ari işletmelerin oluşturulması ve duruma göre çalışmanın ülke geneline yayılması,
- TST'nin Se ve Sp'nin yeterli olmamasına rağmen halen saha şartlarında alternatifsiz olduğu; ancak bazı özel durumlarda IFN-γ testinin yardımcı test olarak ve anerjik hayvanların teşhisinde ise OIE tarafından da valide edilen antikor-ELISA testlerinin uygulanabileceği,
- bTB hastalığıyla mücadelede kullanılacak tanı testlerinin, iyi bağışıklık sağlayan ve tanı testlerine müdahale etmeyen marker aşuların geliştirilmesine yönelik araştırma projelerinin yürütülmesi, alternatif mücadele yöntemlerinin değerlendirmeye alınması,
- Hastalıklarla mücadele ve şüpheli vaka bildirimlerinin duyarlı bir şekilde yapılması için tazminatların mümkün olan en kısa sürede, değerinde, kesinti yapılmadan ve ödenek durumuna bağlı kalınmadan ödenmesi,
- bTB hastalığının çıkması ve karantina sürecinin uzamasına bağlı olarak işletmenin ekonomisinin etkilendiği durumlarda ailenin geçiminin temini ve hayvan yetiştiriciliğini sürdürebilmesi için bu işletmelere uzun vade ödemeli finansman desteği sağlanması,
- Damızlık ihtiyacı olan işletmelere sağlıklı damızlık hayvan temini için ari işletme sayısının ve hayvan mevcudunun artırılması,
- Sosyal projelerin şartnamelerine bTB hastalığı için test uygulama zorunluluğu konularak sağlıklı damızlık hayvanların dağıtılması, hastalığın yayılımının ve yaşanan mağduriyetlerin önlenmesi,
- Hastalıktan ari işletme olmak için şartların kolaylaştırılması, bu işletmelerin örnek olarak denetlemesi ve ari sağlık sertifikası desteklemesinin artırılarak yetiştiricilerin teşvik edilmesi, bTB hastalığı sönüşü yapılan işletmelerden şartları uygun olup, ari işletme olmayı kabul edenlere ari işletmelerden damızlık temin etmesi ve ahır şartlarını iyileştirmesi için TOB'ca düşük faizli kredi desteği sağlanması,
- Ari işletme veya bölgeye zorunlu mesafede ari olmayan işletme kurulmasına izin verilmemesi ve mümkün olduğunca ortak alanları kullanan işletmelerin olduğu yerlerde toplu arilik çalışması yürütülmesi,
- İşletmelere hastalıktan arilik durumuna göre bir skor verilerek gruplandırma yapılması, ari bölgelere işletme risk skorlamasına göre belirlenen riskli gruplara hayvan hareketi öncesi ve sonrasında test uygulama zorunluluğu getirilmesi,
- Fayda maliyet analizi yapılarak işletmedeki bTB pozitif hayvan sayısı belirli bir oranı geçtiğinde RVH tarafından mihrak işletme için depopülasyon kararı alabilmesine izin verilmesi, depopülasyon kapsamında yapılan kesim sonucunda postmortem muayenede bTB pozitiflik tespit edilen hayvanların hastalıklı olarak değerlendirilerek tazminatının verilmesi, sağlıklı hayvanların karkaslarının sınıflandırılarak belirlenen karkas fiyatı üzerinden ESK'ca ödemesinin yapılması,
- TOB'un koordinasyonunda yürütülecek hastalıkla mücadele çalışmalarına paydaş kurumlar olan Sağlık Bakanlığı ve İçişleri Bakanlığı'nca finansman desteği de dahil olmak üzere ihtiyaç duyulan her türlü desteğin sağlanması,
- Tek Sağlık kavramı kapsamında hastalıklarla mücadeleye odaklanacak veteriner hizmetlerinin yürütüleceği TOB'un merkez teşkilatında Genel Müdürlük düzeyinde, taşra teşkilatında ise aynı şekilde hayvan sağlığı dışındaki iş yükünden arındırılmış yeni bir yapılanmaya gidilmesi,
- Tüberküloz ihtisas laboratuvarı içeren enstitü sayısının, insan kaynağının ve tüberkülin üretim kapasitesinin artırılması,
- Hayvan sağlığı alanında çalışmaların yürütüleceği Ar-Ge merkezinin kurularak kurumsal araştırma kapasitesinin geliştirilmesi ve uzman insan kaynağının artırılması,
- Hastalıkla mücadelede görev alacak hastalıklara müdahale ekiplerinin oluşturularak bu işe odaklanılması, görevli bu personele eğitim verilerek sertifikalandırılması, bu hususun personelin atama ve görevlendirilmesinde göz önünde bulundurulması, konu hakkında yıllık toplantı düzenle-

nerek bilgi alışverişinde bulunulması, bu personelin hak kaybı yaşamaması adına ek ödeme için bir model geliştirilmesi, yürütülecek hastalıklarla mücadele çalışmasına inancının ve motivasyonun yükseltilmesi,

- Hastalıkla mücadelede görev alacak personelin yeterli sayıda olması, hastalıklara müdahale için tam donanımlı arazi araçları ve ekipmanın sağlanması,

- bTB hastalığıyla mücadeleye hayvan sağlığı konusunu merkeze alınarak başlanması, hastalığın doğası gereği klinik belirti göstermeden seyrettiğinin, diğer hastalıklara kıyasla mücadele için araçlarımızın az sayıda olduğunun ve mücadelenin uzun yıllar alacağını bilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.



Şekil 2. bTB enfeksiyonunun epidemiyolojik çözüm analizi

Tartışma ve Sonuç

Çok çeşitli konakçı yelpazesine sahip enfeksiyöz ve zoonotik karakterde bir hastalık olan bTB, dünyanın bilinen en eski hastalıklardan biridir ve dünya çapında yayılım göstermektedir. Dünyada yaban hayatı kaynaklı vaka artışlarının görüldüğü ülkeler haricindeki gelişmiş ülkelerde eradike edilmiş veya eradike edilme noktasına gelmesine rağmen gelişmekte olan ülkeler ile az gelişmiş ülkelerde hala sorun oluşturmaya devam etmektedir. Bu zoonoz hastalık hayvanların sağlığı ve refahıyla birlikte insanların hem sağlığını hem de ekonomisini olumsuz yönde etkilemeye devam etmektedir. Bugün hala en fakir ve marjinal toplumlarda var olduğundan önleme, tanı ve tedavide zorluklar yaşanmaktadır. Dünyadaki bazı ülkelerde hayvanlar ve insanlar arasında bTB'nin yeniden görülmesi, çoklu ilaç dirençli *M. bovis* suşlarının artması, pediatrik hastalarda *M. bovis*'in

yüksek insidansı ve Human Immunodeficiency Virüsü (HIV) ile ko-enfeksiyonun sıklığı geleceğe yönelik baş edilmesi gereken ciddi sorunlardır.

On dokuzuncu yüzyılın son çeyreğinde dünya ile eş zamanlı olarak Osmanlı İmparatorluğu'nda da bTB hastalığıyla ilgili korunma, mevzuat, tüberkülin üretimi ve mücadele çalışmalarına başlanmıştır. Sonraki yıllarda araya savaşların girmesiyle hastalıkla mücadelede aksamalar yaşanmış olmasına rağmen Türkiye Cumhuriyeti dönemindeki ilk 15 yıllık süreçte Osmanlı İmparatorluğu döneminde yayımlanan mevzuatlar yenilenecek hayvan sağlığı ve ıslahı çalışmalarında önemli başarılar imza atılmıştır. Yaklaşık yarım asırlık bir sürede çeşitli çalışmalar yürütüldükten sonra 1985 yılında her yönüyle planlanarak beş yıllık "Türkiye Tuberculosis Mücadele Projesi" başlatılmış ancak 1987 yılında projenin tazminat ödemelerinde finansman yetersizliği baş göstermiş-

tır. Sonraki süreçte hastalığın prevalansı ve mihrak sayıları yıllar itibariyle artarak günümüze gelinmiştir. Son olarak ülke genelinde bTB mihrak sayıları 2019 yılında 2.248 mihrakla ülke tarihinin en yüksek rakamına erişmiş ve 2020 yılında bir miktar gerileme yaşanarak 1.913 mihrak görülmüştür.

bTB hastalığının klinik belirti göstermeden seyretmesi, kolay bulaşması, tanı testlerinin eksik sensitivite ve spesifitesi, iyi bağışıklık sağlayan ve tanı testlerine müdahale etmeyen etkin marker bir aşısının bu güne kadar geliştirilememiş olması ve mücadelesinin uzun soluklu olması gibi kendi doğası gereği zorlukları bulunmaktadır. Bunların yanı sıra bulgular bölümünde verilen Türkiye'ye özgü zorluklara bTB enfeksiyonunun epidemiyolojik sorun analizi ile özetine Şekil 1'de, ayrıca bTB enfeksiyonunun epidemiyolojik çözüm önerileri ile özet bilgilere Şekil 2'de yer verilmiştir.

Sonuç olarak; hem hayvan sağlığı hem de halk sağlığı için önem taşıyan bTB hastalığıyla mücadelede; ülke örneğini temsil edecek yerlerde yürütülecek survey çalışmasıyla belirlenecek prevalansa göre bütçesi, personel sayısı, iş yükü, araç sayısı vb. ihtiyaçların hesaplanarak bir plan oluşturulması; belirlenen bu plan dahilinde çalışmanın kademeli mi yoksa ülke geneli bir tarama şeklinde mi yapılacağına karar verilmesi; alınan bu kararın uzun süreli devlet politikasına dönüştürülmesi ve proje süresince sürdürülebilir finansman desteğinin sağlanması; tam anlamıyla izlenebilen bir kimliklendirme ve kayıt sisteminin oluşturulması; hayvanın geldiği işletme ve orijin işletmelerin geri izlemesinin tam olarak yapılması; ilgili tüm kurumlarla birlikte hareket edilerek belgesiz hayvan hareketlerinin, hayvan tüccarlarının, hayvan pazarlarının kontrol altına alınması; şarta tabi hayvanların kesiminde ESK'nın görevlendirilmesi; ESK tarafından hızlı bir kesim ve ödeme sisteminin oluşturulması; özel kesimhanelerin ve kaçak kesimlerin etkin bir şekilde denetlenmesi; hayvan sağlığı ve refahına uygun olarak işletmelerin sınıflandırılarak şartlarının iyileştirilmesi; sağlıklı damızlık temini için ari işletme-hayvan sayısının artırılması ve sosyal projelerde ari damızlık hayvanların dağıtılması; mera ve su kaynağı, boğa kullanımı gibi ortak kullanım alanlarının sınırlandırılması; genel olarak temizlik, dezenfeksiyon ve biyogüvenlik önlemlerine tam anlamıyla uyulması; eğitim, motivasyon, bilgi paylaşımı, araç ve ekipman eksikliğini giderilmesi; hayvan sağlığı hizmetleri dışındaki gereksiz iş yükünden arındırılarak "Tek Sağlık" konsepti çerçevesinde hastalıklarla mücadeleye odaklanan genel müdürlük ve taşra birimleri yeniden düzenlenen veteriner hizmetleri kurumsal yapısının yeniden oluşturulması sonrası-

da uzun sürede, seferberlik ruhuyla ve sabırla yürütülecek bir çalışmayla hastalığın prevalansı azaltılıp, kademeli ari bölgeler oluşturularak başarıya ulaşılabileceği mütalaa edilmiştir. Son söz olarak, bu hastalıkla mücadelede, hastalığın doğası ve Türkiye'nin şartları düşünüldüğünde kısa sürede bir sonuç beklenmemelidir.

Teşekkür: Bu araştırma, Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM/HSGYAD/Ü/20/A5/P1/1643 numaralı ülkesel bir proje olarak desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir ve deney hayvanları etik kurulu iznine gerek yoktur.

Kaynaklar

- Bezoz J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, López L, Rueda P, Domínguez L. (2014) Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 97(S), S44-52. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.002>
- Claridge J, Diggle P, McCann CM, Mulcahy G, Flynn R, McNair J, Strain S, Welsh M, Baylis M, Williams DJL. (2012) *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nat Commun.* 3, 853-858. <https://doi.org/10.1038/ncomms1840>
- Hassan AS, Garba SM, Gumel AB, Lubuma JMS. (2014) Dynamics of mycobacterium and bovine tuberculosis in a human-buffalo population. *Comput Math Methods Med.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/912306>
- Michel AL, Müller B, Van Helden PD. (2010) *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol.* 140, 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.029>
- Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A, Dean AS, Mumford E, Erlacher-Vindel E, Forcella S, Silk BJ, Ditiu L, El Idrissi A, Raviglione M, Cosivi O, LoBue P, Fujiwara PI. (2017) Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *Lancet Infect Dis.* 17, e21-e25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)
- Pandey A, Cabello A, Akoolo L, Rice-Ficht A, Arenas-Gamboa A, McMurray D, Ficht TA, De Figueiredo P. (2016) The case for live attenuated vaccines against the neglected zoonotic diseases brucellosis and bovine tuberculosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 10, 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004572>
- Rossi G, De Leo GA, Pongolini S, Natalini S, Vincenzi S, Bolzoni L. (2015) Epidemiological modelling for the assessment of bovine tuberculosis surveillance in the dairy farm network in Emilia-Romagna (Italy). *Epidemics.* 11, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2015.02.007>
- Viviani P, Tufan M, Kirandjiski T, Ediz B, Çağatay M, Aktaş S, Nazzari N, Bozkurt Z, Özgenç Y, Kılınç B, Göral A, Özkan D, Agah H, Tizzani P, Diker KS, Akan M, Yılmaz H, Aydın L, Hasöksüz M, Altun S, Sensi M, Petrini S, Magistrali C, Karslıoğlu N, Budak N, Karakoyunlu İ, Coşgun E. (2016) Veteriner Hizmetleri Strateji Belgesi Nihai Raporu. Avrupa Birliği (Agrotec SPA) ve Tarım ve Orman Bakanlığı.



Tarihsel bir biyolojik ajan ve KBRN açısından önemi: Ruam, Mankafa "*Burkholderia mallei*"

Ahu Pakdemirli^{1*} , Dilek Dülger² 

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Karabük Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Karabük, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.05.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 08.07.2021

Özet: Biyolojik ajanların silah olarak kullanılması çok uzun yıllardır sürmektedir. Bunlardan biri de Ruam *Burkholderia mallei* etkenidir. Bu tür silahlar kitlesel olarak ölümlere yol açabileceği için eski zamanlardan beri insanlığın gündemindedir. Özellikle atlı süvarilerin kullanıldığı zamanlarda çok daha etkin bir biyolojik silah olan ruam, Birinci ve İkinci Dünya Savaşı'nda da biyolojik silah olarak kullanılmıştır. Çok etkili olamadığı için kullanımı zamanla azalsa da günümüzde hala önemini kaybetmemiştir. Hala daha Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi tarafından yapılan Bioterörizm Etkenleri ve Hastalıklar Listesi, Biyolojik Silahlar Konvansiyonu'nun Önemli Tehlike Arz Eden Etkenler Listesi ve Avrupa Birliği Bioterörizm Çalışma Grubu Listesinde bulunmaktadır. Bu çalışmada ruam hakkında genel tanımlama yapılırken, halk sağlığı ve biyolojik silah olarak kullanımı konusunda güncel literatürler kullanılarak derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyolojik savaş, Biyolojik silah, Bioterörizm, *Burkholderia mallei*, KBRN, Ruam

A historical biological agent and its importance for CBRN: Glanders "*Burkholderia mallei*"

Summary: The use of biological agents as weapons has been around for many years. One of them is the Glanders *Burkholderia mallei* factor. Such weapons have been on the agenda of humanity since ancient times, as they can lead to mass deaths. Glanders, which was a much more effective biological weapon especially when horse cavalry was used, was used as a biological weapon in the First and Second World War. Although its use decreases over time because it is not very effective, it still has not lost its importance today. It is still included in the list of bioterrorism factors and diseases made by the United States Center for Disease Protection and Control, the list of seriously dangerous factors of the Biological Weapons Convention and the European Union Bioterrorism Working Group List. In this study, while making a general description about glanders, public health was compiled using current literature on its use as a biological weapon.

Keywords: Biological warfare, Biological weapons, Bioterrorism, *Burkholderia mallei*, CBRN, Glanders

Giriş

Biyolojik etkenler tarih boyunca insanlık tarafından silah olarak kullanılmıştır. Bunun ilk örneklerinden biri milattan önce 190 yıllarında Kartacalı General Hannibal'ın Bergamalı düşman gemilerini alt etmek için yılan zehri kullanması olarak gösterilebilir. Ancak bu verilerin o sırada oluşan bir hastalıktan mı yoksa kasıtlı kullanıma mı bağlı olduğu henüz tam açıklanamamış değildir (Alp ve Doğanay 2006).

Ruam *Burkholderia mallei*, genellikle atları, eşekleri ve katırları etkileyen bir hastalıktır. Yaygın olmasa da, ruam insanlara hasta hayvanlardan bulaşır ve hayvanlarla yakın temas halinde olan kişilerin, olmayanlara göre hastalığa yakalanma olasılığı daha yüksektir (Whitlock ve ark. 2007).

B. mallei, 1881 yılında enfekte karaciğer ve da-laktan izole edilmiş olsa da 1882 yılında Loeffler ve Schütz tarafından tanımlanmıştır (Allan ve Dance 2009). Daha öncelerde *Loefflerella mallei*, *Actinobacillus mallei*, *Pfeifferella mallei*, *Malleomyces mallei*, *Mycobacterium mallei*, *Coryne-bacterium mallei*, *Pseudomonas mallei* ve *Bacillus mallei* olarak tanımlanmıştır (Whitlock ve ark. 2007). Ruamın hayvanlardan insanlara bulaştığı yönünde ilk gözlem 1912 de Lorin adlı bir Fransız askeri doktor tarafından yapılmış aynı yıl Yüzbaşı Noyan ve Veteriner Hekim Ahmet Şefik Kolaylı Türkiye'de bir nalbant askerinde ruam olgusu saptamış, 1938-1948 yıllarında 18, 1950-58 yıllarında 24 vaka ve 2 adet ölüm bildirilmiştir (Uçar 1960). Yine Türkiye'de 1958 ve 1959 yıl-

larında hayvanlarda çıkan mihrak miktarları sırası ile 195 ve 232'dir (Uçar 1960).

Türkiye'de 13.12.1983 tarihli Cumhuriyet Gazetesinde "Gülhane Hayvanat Bahçesi dört aslanın ölüm nedeninin ruam olduğu belirlenmiş ve yapılan araştırmada hayvanlara tek tırnaklı eti yedirildiği belirlenmiştir" haberine rastlanmaktadır. Haberi inceleyecek olursak: "Bir laborant ruam şüphesiyle karantina altına alındı Gülhane Parkı Hayvanat Bahçesi'ndeki iki hafta önce görülen ruam salgınında, hayvanların tedavisinde görevli bir laborantın ruam şüphesiyle karantina altına alınmasına neden oldu. Veteriner Fakültesi'nde laborant olarak çalışan ve hastalığa yakalanan hayvanların tedavisinde görevli Dursun Biga'nın laboratuvar çalışması sırasında eline iğne battı. Bunu önemsemeyen Dursun Biga'nın iğne batan parmağının şişmesi ve kendisini rahatsız etmesi üzerine önce Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde dolama tedavisi gördüğü bildirildi. Ancak yaranın geçmemesi kızartının eline yayılması iş arkadaşlarının ve öğretim üyelerinin dikkatini çekti, çeşitli hastaneleri dolaştıktan sonra eline iğne batışının 11. gününde Cerrahpaşa'da karantina altına alındı. Fakülte öğretim üyelerinden Doç. Dr. Bağdatlı, "Biga'nın elindeki yaranın yılanlık da olabileceğini, henüz laboratuvar incelemelerinin sürdüğünü ve ruam teşhisi için henüz erken olduğunu" bildirdi. Gülhane Hayvanat Bahçesi'nde ruamdan 2 aslan ölmüştür."(Cumhuriyet Gazetesi 1983).

İstanbul Adalar'da yapılan bir çalışmada 1128 ata mallein testi uygulanmış, 35 atta reaksiyon görülmüş ve 10 tanesi ileri analizler için ötanazi edilmiş ve beş tanesinde patolojik bulgulara rastlanmıştır (Arun ve ark. 1999)

Türkiye Dünya Hayvan Sağlığı Ofisine 2017 ve 2019 yıllarında ruam vakası bildirmemiştir. İnsan vakası bildirilmemiştir. Brazilya'da 2020 yılında, 11 yaşında bir erkek çocuğu göğüs ağrısı ve dispne, septik şok, pnömoni, çoklu apseler ile acil servise başvurmuş ve etken eksudat kültüründe belirlenmiştir (Júnior ve ark. 2020).

Hastalık Kuzey Amerika, Avustralya ve Avrupa'da ithalat kontrol önlemleriyle birlikte test edilerek ve daha sonra enfekte olmuş hayvanlar itlaf edilerek ortadan kaldırılmıştır. 1998 – 2007 yılları arasında Brezilya, Türkiye, eski SSCB, Eritre, Etiyopya, İran, Irak, Birleşik Arap Emirlikleri ve Moğolistan'da sporadik salgınlar bildirilmiştir (Torba 2020). Bununla birlikte, bazı Asya, Afrika, Orta Doğu ve Güney Amerika ülkelerinde ara ara bildirimler devam etmektedir. Nisan 2010'da Bahreyn, hastalığın ilk ortaya çıkışını, Brezilya ise 2009'da hastalığın yeniden

ortaya çıkışını bildirmiştir. İngiltere'de 1928 (Al-ani ve Roberson 2007), Amerika Birleşik Devletleri'nde 1942 yılında eradike edilmiştir (Curling ve ark. 2010).

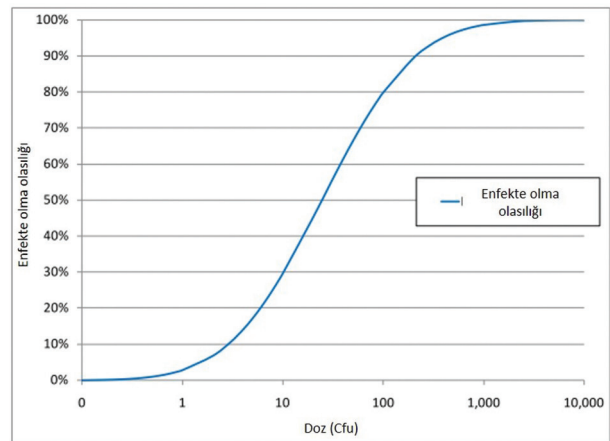
Sovyetler'in ruamı silah olarak 1982-84 yılları arasında Afganistan'da kullandığı Alibek ve Hanselman'a atıfla bildirilmiştir (Zandt ve ark. 2013).

Kimyasal, biyolojik, radyoaktif, nükleer (KBRN) açısından değerlendirmeden önce ruam hakkında genel bir bilgilendirme uygun olacaktır.

Etiyoloji

B. mallei Gram negatif, orta büyüklükte, çomak şekilli, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz bir bakteridir. Oksidatif ve zorunlu aerobik, karbonhidratları metabolize edebilen ve birçoğu katalaz ve oksidaz pozitifdir. En iyi üreme 37°C'de, %1 gliserol ile gerçekleştirilen izolatların %75'ten fazlası MacConkey agarda iyi ürer. Taze kültürlerde etken uzun ve ince çomak görünümündeyken, eskiyen kültürlerde kokoidden uzun flamentlere kadar değişen pleomorfik görüntüler elde edilir. Kanlı agarda hemoliz görülmez. Ekzotoksini yoktur, endotoksini ise sıcaklığa dayanıklıdır ve malleinin esasını oluşturur.

B. mallei, enfekte hayvan dokuları, vücut sıvıları ile temas yoluyla insanlara bulaşır. Etken deri bütünlüğünün bozulduğu kesik ve sıyrıklardan veya göz ve burun gibi mukozalardan vücuda girer. Bunun yanında, enfekte parçacıkların solunmasıyla da bulaşma gerçekleşebilir.



Şekil 1. Alınan bakteri miktarına bağlı olarak enfekte olma olasılığı (Curling ve ark. 2010).

Hayvanlarda ise solunum, bulaşık suların içilmesi, karlık, atlık ve koşum takımlarının kullanılması gibi yollarla bulaşma gerçekleşirken, ev sineği (*Musca domestica*) lezyonlardan beslenirken diğer hayvanlara etkenleri taşıyıcı olarak önemli rol oynar (Al-ani

ve Roberson 2007). Hayvanlar, enfekte hayvanlara temaslarının yanında, ölü hayvanları yemeleri sonucu da enfekte olabilirler. Veteriner hekimler, at bakıcıları, laboratuvar çalışanları gibi meslek grupları risk altındadır (Doğanay ve ark. 2020). Hayvandan hayvana bulaşma durumunda, en yaygın enfeksiyon kaynağı, muhtemelen solunum yolundan akıntılar veya taşıyıcı hayvanlardan ülsere deri lezyonları yoluyla kontamine yiyecek veya suyun yutulması gibi görünmektedir (Khakhum ve ark. 2019). Bakterilerin vücuda giriş miktarı hasta olma olasılığını değiştirebilmektedir. Ruam için vücuda dahil alınan bakteri miktarına bağlı olarak enfekte olma olasılığı Şekil-1'de gösterilmiştir.

Klinik Belirtiler

Hastalık atlarda kronik, merkep ve katırlarda ise akut olarak görülür. İnsanlarda ise lokalize, kronik dissemine, pulmoner ve septisemik olarak dört çeşit tanımlanmıştır. Lokalize enfeksiyonlar, deride solunum sisteminde ve iç organlarda nodül ve ülserlerin oluşması ile karakterizedir, genellikle sınırlıdır ve süpürasyon odakları görülür, ancak dissemine olabilir ve septisemiye yol açabilir. Apseler, uzun süre içinde drene ve ülsere olabilir. Akut hastalık formunun kuluçka süresi 1-14 gün, kronik formun kuluçka süresi ise 12 haftaya kadar uzayabilir. Lokalize enfeksiyonlar, hastalık etkeni ile temastan 1-5 gün içinde gelişir ve etkilenen bölgede şişlik ve akıntı görülür. Akut pulmoner enfeksiyonlar, 10-14 günlük inkübasyon süresi sonrasında belirti göstermeye başlar. Septisemi etkenin vücuda alınmasının akabinde veya ilk enfeksiyondan iki hafta sonra görülebilir. Pnömoni tablosu hızlı bir şekilde görülür ve tedavi edilmez ise 10-30 gün içinde ölümlerle sonuçlanır. En yaygın görülen klinik bulgular düşük ateş, halsizlik, yorgunluk, göğüs ağrısı, baş ve sırt ağrısı dahil miyalji, lenfadenopati olarak belirtilebilir. Diğer belirtileri ise lenf düğümlerinde hassasiyet, karın, boğaz ve göğüs ağrısı, fotofobi, bulanık görme, splenomegali, ve lakrimasyondur.

Kutanöz formda vücudun herhangi bir yerinde papüler lezyonlar görülebilir. Etkenlerin vücut bütünlüğünün bozulduğu yerlerden girişi sonucunda ağrı ve şişlik görülür. Enflamasyon bölgesel lenfatikler boyunca uzanabilir ve hastalık süresince süpürasyon odakları ile lenfanjite neden olabilir. Lenfatik damarlar palpe edilebilir. Enfeksiyon lokalize kalabileceği gibi tedavi edilmez ise disseminasyon görülebilir.

Mukozal form kirli eller ve nesnelere, havadaki partiküllerin mukoza ile teması ile oluşur. Etkenin göz ve konjonktival tutulumu aşırı lakrimasyon ve

fotofobi ile karakterizedir. Burun yoluyla etkenlerin girişinde burun iltihabı ve şişmesi görülür. Bol miktarda burun akıntısı olabilir. Enfeksiyon burun septumu ve kemik dokularına invaze olarak fistül ve doku yıkımına yol açabilir. Yüzde şişlik ve lokal lenfadenit görülebilir ve enfeksiyon, solunum yollarına invaze olabilir. Hastalığın yayılması ile öksürük, mukopürülant balgam ve bronşit görülebilir. Ateş ve titreme eden ilk birkaç gün içinde görülür.

Akciğer formu hava yoluyla etkenlerin vücuda girişinden sonra veya yayılan enfeksiyonun sonucu görülebilir. Üst solunum yolunun enfeksiyonu ile servikal lenfadenopati görülebilir. Pulmoner enfeksiyon pnömoni, pulmoner apse, plörit ve plevral efüzyon ile sonuçlanır. Pulmoner enfeksiyonda öksürük, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve mukopürülant balgam görülebilir. Yorgunluk, ateş, titreme, baş ağrısı, miyalji, lenfanjit, boğaz ve plöretik göğüs ağrısı, öksürük, taşipne, dispne ve gastrointestinal sistem bozukları gibi genel hastalık bulguları görülür. Semptomların görülmesi iki-üç haftayı bulabilir. Biyolojik saldırılarda bu form en önemli form olabilir (Bossi ve ark. 2004).

Laboratuvar testi

Lezyon eksüdatalarının gram boyası, küçük gram negatif bakterileri ortaya çıkarır. *B. mallei*, sıradan besleyici agarda yavaş büyür. Aglutinasyon testleri 7-10 gün boyunca pozitif değildir ve normal serumlarda yüksek arka plan titresini (1: 320 1: 640'a kadar) yorumlamayı zorlaştırır. Kompleman sabitleme testleri daha spesifiktir ve titre 1: 20'ye eşitse veya 1: 20'yi aşıyorsa pozitif kabul edilir. Septisemik vakalarda otopsi nodüllerinin kültürlerinde genellikle *B. mallei'nin* varlığı görülür. Bunun haricinde PCR yöntemleri de teşhis yöntemi olarak kullanılmakta, ayrıca *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* ve *Burkholderia thailandensis* ayırımında yardımcı olmaktadır. (Zakharova ve ark. 2017). Agar jel immunodifüzyon (AGID), Counter immuno electrophoresis (CIE) test, Indirect haemagglutination (IHA), Complement Fixation Test (CFT), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri kullanılabilir (Al-ani ve Roberson 2007). Valide edilen bir immunflorasan metot çalışmasında IFA; ELISA, CFT ile karşılaştırılmış ve immun florasan (IFA) metodunun teşhiste kullanılabileceği belirtilmiştir (Jamooli ve ark. 2016). Sahada hızlı tanı yapılabilecek yöntemlerden polimerase amplifikasyon lateral flow assay (RPA-LF) konusunda da umut vaat eden çalışmalar yapılmaktadır ve gerçek örneklerle geçerli kılma çalışmaları gerekmektedir (Saxena ve Pal 2019).

Ayırıcı tanı

Ayırıcı tanı, klinik belirtilere bağlıdır. İçinde pnömoninin yaygın nedenleri, potansiyel biyoterörizm etkenleri ve zoonotik hastalıklara ek olarak melioidoz, veba ve tularemiyi içerir. Ruam papüler veya püstüller deri lezyonları çiçek hastalığı döküntülerine benzeyebilir (Arizona Department of Health Services 2004).

Dayanıklılık

Laboratuvar çalışmaları, nemli killi topraklarda 30 aya kadar yaşayabildiğini göstermiştir. Kuru kumlu toprakta çok daha kısa bir süre dayanır. Ilıman bir bölgede %10 nem içeriğine sahip toprakta 70 gün içinde, %40 nem içeriğinde ise 726 gün etkenler canlı kalabilir.

Dekontaminasyon ve izolasyon

Hastalarla temas ve mesafe önlemleri alınmalıdır. Cilt lezyonları ve sekresyonları ile temas eden kişiler sabun ve su kullanılmalıdır. Ekipman, giysi ve diğer nesnelere ve çevresel dekontaminasyon için %0,5 hipoklorit solüsyonu (1 kısım çamaşır suyu ve 9 kısım su =%0,5 çözelti) etkilidir (Arizona Department of Health Services 2004). *Etken*; alkol içindeki civa klorür, benzalkonyum klorür, iyot, potasyum permanganat, %1 sodyum hipoklorit, %70'lik etanol ve %2'lik glüteraldehit gibi yaygın kullanılan dezenfektanlara karşı oldukça hassas, fenolik maddelere karşı daha az duyarlıdır. Ölü ve enfekte hayvanların bulunduğu yerlerin dezenfeksiyonunda bu maddeler kullanılabilir. Ayrıca 10 dakika boyunca 55°C'de 10 dakika uygulanan sıcaklık veya ultraviyole lamba ile *B. mallei* etkisizleştirilebilir (Whitlock ve ark. 2007).

Korunma, kontrol ve tedavi

Tek tırnaklıların veteriner hekimlik hizmetlerinin devamlılığı çok önemlidir. Ruam hastalığı 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu; Ruam Hastalığına Karşı Korunma ve Mücadele Yönetmeliği; Hayvan Hastalıklarında Tazminat Yönetmeliğine göre Bildirimi Zorunlu ve Tazminatlı Hastalıktır. Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nde üretilen "Etlik İntradermik Sauton Mallein" ile sahada şüpheli hayvanlara test yapılır. Mallein testi sonucu pozitif olan atlar itlaf edilir, şüpheli olanlara 20 gün sonra yeniden test uygulanır ve şüpheli ya da pozitif çıkması durumunda itlaf edilir. Hayvanlara tedavi uygulanmaz.

İnsanlarda ruam tedavisi konusunda çok az deneyim vardır; bu nedenle az sayıda antibiyotik *in vivo* değerlendirilmiştir. 1950'den sonra bazı sülfonamidlerin ruam etkenine karşı olan etkisinin anlaşılma-

ıyla ölüm vakaları oldukça azalmıştır (Uçar 1960). Tedavi, klinik durumun türü ve şiddetine göre değişir. Şiddetli hastalık, başlangıçta parenteral tedavi gerektirir. Uzun süreli oral antibiyotik tedavisi nükssetmeyi önlemek için birçok ay gereklidir. Setazidim ve trimetoprim-sülfametoksazol veya imipenem ve doksisisiklin olarak antibiyotik tedavisi insanlarda denenebilir. Çeşitli izolatlar farklı antibiyotik duyarlılıklarına sahip olduğundan, her izolat için antibiyotik duyarlılığı test edilmelidir (Arizona Department of Health Services 2004). Sulfadiazine deney hayvanlarında ve insanlarda etkili olduğu bulunmuştur. *Burkholderia mallei* genellikle tetrasiklinlere, siprofloksasin, streptomisine, novobiyoisin, gentamisin, imipenem, seftazidim ve sülfonamidlere duyarlıdır. Kloramfenikole direnç bildirilmiştir. Tedavide kinolonlar, trimetoprim/sulfametoksazol, doksisisiklin ve rifampisin kombine veya tek başına kullanılabilir.

Aşı konusunda günümüzde çalışmalar devam etmekte olsa da henüz aşısı bulunmamıştır (Arizona Department of Health Services 2004). Canlı atenuë, membran parçaları, protein subunit aşıları geliştirme aşamalarında (Titball ve ark. 2017) (Silva ve Dow 2013).

Halk sağlığı açısından önemi

Hayvanlar arasında doğrudan ya da dolaylı yoldan görülen bulaşma görülür. Doğrudan bulaşma hasta hayvanların solunum havası, etken ile bulaşık suların içilmesi, kirli altlık, tımar ve koşum takımlarının kullanılmasıyla oluşurken, insanlar etkeni enfekte hayvanlar ile temas sonucu alırlar. Laboratuvar çalışmaları sırasında solunum ve laboratuvar kazaları ile hasta olan vakalar bulunmaktadır.

Aşısı bulunmamaktadır. Klinik hastalığı olan hayvanlara ek olarak, asemptomatik olarak enfekte hayvanlar insanlar için bir risk oluşturmaktadır. İnsanlar tesadüfi konakçılardır ve insandan insana bulaşma nadirdir.

Tedavi için hastane yatışı gereklidir ve diğer hastane hizmetlerini de aksatabilir. Tedavi birkaç ay sürer. Semptomlar pnömoni, grip veya tüberküloz gibi daha yaygın hastalıklarla aynıdır, birçok hastalıkla karıştırılabilir. Tüm dünyada her yıl sadece birkaç kişiye ruam teşhisi konmaktadır. İnsanlarda ruam çok nadir olduğu için çoğu doktor hastalığa aşina değildir. Ruam tedavi edilmez ise %90-95 ve tedaviye başlanırsa %40 fatalite hızına sahiptir. Fatalite hızı enfeksiyonun formuna ve tedavi durumuna göre değişiklik gösterir.

Biyoterörizm ve Ruam

İnsan salgınları kaydedilmemiş olsa da Ruam'ın insan popülasyonlarında izole salgınlar oluşturma ve biyolojik bir silah olarak kasıtlı kullanım potansiyeli mevcuttur (Whitlock ve ark. 2007).

Ruam Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi tarafından yapılan Biyoterörizm Etkenleri ve Hastalıklar Listesi'nde Grup B'de yer almaktadır (Tablo-1).

Tablo 1. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkez tarafından yapılan Biyoterörizm Etkenleri ve Hastalıklar Listesi (CDC 2021).

Kategori	Tanım	Etkenler
A	Yüksek öncelikli, Yayılmaya veya iletilmesi kolay (kişiden kişiye), Yüksek ölüm oranları, Önemli halk sağlığı etkisi potansiyeli, Halkta paniğe ve sosyal bozulmaya neden olur, Halk sağlığı hazırlığı için özel eylem gerektirir.	Şarbon (<i>Bacillus anthracis</i>) Botulizm (<i>Clostridium botulinum</i> toksini) Veba (<i>Yersinia pestis</i>) Çiçek hastalığı (variola majör) Tularemisi (<i>Francisella tularensis</i>) Viral hemorajik ateşler, aşağıdakiler dahil Filovirüsler (Ebola, Marburg) Arenavirüsler (Lassa, Machupo)
B	Yayılmaya orta derecede kolaydır, Orta derecede morbidite oranları ve düşük mortalite oranları ile sonuçlanır; ve CDC'nin teşhis kapasitesinin özel olarak geliştirilmesini ve gelişmiş hastalık sürveyansını gerektirir.	Bruselloz (<i>Brucella</i> türleri) <i>Clostridium perfringens</i> 'in Epsilon toksini Gıda güvenliği tehditleri (<i>Salmonella</i> türleri, <i>Escherichia coli</i> O157: H7, <i>Shigella</i> sp.) Ruam <i>Burkholderia mallei</i> Melioidosis (<i>Burkholderia pseudomallei</i>) Psittacosis (<i>Chlamydia psittaci</i>) Q ateşi (<i>Coxiella burnetii</i>) <i>Ricin</i> us <i>communis</i> kaynaklı risin toksini (Hint fasulyesi) Stafilokokal enterotoksin B Tifüs ateşi (<i>Rickettsia prowazekii</i>) Viral ensefalit (doğu at ensefaliti, Venezüella at ensefaliti ve batı at ensefaliti gibi alfavirüsler) Su güvenliği tehditleri (<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i>)
C	Üçüncü en yüksek öncelikliler, Kitlesele yayılma için tasarlanabilecek yeni ortaya çıkan patojenleri içerir, Üretmesi ve yayması kolay, Yüksek morbidite ve mortalite oranları, Büyük halk sağlığı etkisi potansiyeli vardır.	Nipah virüsü ve hantavirüs gibi ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklar

Ruam'ın savaş sırasında solunum yoluyla bulaşması ve iltihaplı deri ve akciğer enfeksiyonları ile seyretmesi beklenir (Khan ve ark. 2012). Enfekte sekresyonlardan da ikincil olarak bulaşma görülebilir (Arizona Department of Health Services 2004). Enfektif dozu az, tüm insanları etkileyebilir ve inkübasyon periyodu 10-14 gün arasındadır. Göğüs röntgeninde lobar pnömoni, akciğer apseleri, plevral efüzyon, sepsis olması halinde vücudun çeşitli bölgelerinde multiple kutöz apselerle seyreden lezyonlar, nazal ülserler, kanlı akıntılar içeren lezyonlar içerir. Deriden girmesi halinde lenf düğümlerine ulaşır ve lokal ülseratif lezyonlar gözlemlenir. Karaciğer, dalak, kol ve bacak kaslarında nekrotik granülomatöz lezyonlar içeren -kronik seyirli vakalar izlenebilir, tedavi edilmeyen septisemiler ölümle sonuçlanabilir (Arizona Department of Health Services 2004).

B. mallei I. Dünya Savaşı'nda kullanılan tarihteki ilk biyolojik savaş ajanlarından birisidir (Torba 2020). Birinci Dünya Savaşı'nda Rusya'da çok sayıda insan ruam vakası bildirilmiştir. Balkan Savaşı, I. Dünya Savaşı ve Kurtuluş Savaş'larında hızla yayılım gösteren epidemiler bildirilmiştir (Doğanay ve ark. 2020). Almanya antraks ve ruam ile enfekte atları müttefiklerine, Romanya'da koyunları Ruslara, İngiliz ve Hindistan askeri kuvvetlerine satmıştır (Jones 1992). Antraks ve ruamın birlikte kullanıldığı sabotaj girişimleri, askeri olarak beklenen başarıları gösterememiştir (Oliveira ve ark. 2020). Birinci ve ikinci Dünya Savaşlarında Doğu cephesindeki Rus atlarının ve karıtlarının enfekte edilmesi ve Birinci Dünya Savaşında Çin'de bulunan Pinfang Enstitüsündeki insanları ve hayvanları enfekte etme de kullanılmıştır (Sathua ve Flora 2020) Amerika Birleşik Devletleri Hastalık

Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) biyoterörizm ajanlarını üç kategoriye ayırmıştır. Kategori A patojenleri, yayılma kolaylığı ve yüksek ölüm oranları ile halk sağlığı ve ulusal güvenlik için en yüksek riskle ilişkilidir. Kategori B patojenleri orta derecede yayılma ve ölüm kolaylığı ile ikinci en yüksek önceliğe sahipken, Kategori C yaygın yayılan bulaşıcı patojenler içerir. Ruam bu sınıflamaya göre Kategori B'de yer almaktadır (Pakdemirli 2021). Ruam, Biyolojik Silahlar Konvansiyonu'nun önemli tehlike arz eden etkenler listesi (Tablo-1) ve Avrupa Birliği Biyoterörizm Çalışma Grubu Listesinde bulunmaktadır (Tegnell ve ark. 2006).

Tablo 2. Biyolojik Silahlar Konvansiyonun Tehlikeli Etkenler Listesi (Tegnell ve ark. 2006).

Anthraks (<i>Bacillus anthracis</i>)
Botulismus toksini (<i>Clostridium botulinum</i> toksini)
Vebe (<i>Yersinia pestis</i>)
Çiçek (<i>Variola major</i>)
Tularemi (<i>Francisella tularensis</i>)
Viral haemorrhagic fevers Brucellosis (<i>Brucella</i> sp.)
Ruam (<i>Burkholderia mallei</i>)
Q-humması (<i>Coxiella burnetti</i>)
Hintyağı bitkisinden (<i>Ricinus communis</i>) elde edilen Risin toksini
Staphylococcus enterotoksini B
Viral ensefalit etkenleri (alphaviruses [Örn:Venezuelan equine encephalitis, eastern equine encephalitis, western equine encephalitis]).

Ruam, biyoterörde kullanılabilir. Spesifik anti-biyotiklerle hızlı tedavi olamayan insanlar ruamdan ölebilir. Ruam nadir görülen ve iyi bilinmeyen bir hastalıktır, bu da sağlık teşkilatının hızlı ve doğru bir şekilde teşhis koymasını zorlaştırabilir. Geçmişte biyolojik silah olarak kullanılmıştır. Biyoterörizm amacıyla ruam etkenleri havaya, suya veya yiyecek tedarik zincirine bulaştırılabilir ve insanlar hasta olabilir. Enfektif dozun düşük olduğu varsayılır ve tüm insanlar duyarlı kabul edilir. Kuluçka süresi 10 ila 14 gün arasında değişir (Bossi ve ark. 2004). Tedavi edilmediğinde septisemi genellikle 7-10 gün içinde ölümcül olur (Al-ani ve Roberson 2007).

Ruam hastalığı I. ve II. Dünya Savaşları'nda süvari birliklerinin savaş dışı bırakılması için kullanılmıştır. İnsan ve hayvan aşılı henüz gelişme aşamasındadır. Etkenden alınan dış membran parçalarından yapılan denemelerde farelerde ve insan olmayan primatlarda önemli derecede hastalığa karşı koruyucu bağışıklık tepkileri görülmüştür. (Baker ve ark. 2017).

Savaşlarda süvari birliklerinin ve diğer hayvanların öneminin kaybolmasıyla birlikte biyolojik silah olarak önemini kaybetse de hala tarih sayfalarında yerini almaktadır. Bu durum tekrar kullanılmayacağı

anlamına gelmediği için bu tür hastalıklar konusunda sürekli tetikte olarak eğitimler düzenlenmesi, acil durum senaryoları için hazırlıklı olunması, sahada hızlı ve laboratuvarında teşhis tekniklerinin geliştirilmesi ve aşı geliştirme çalışmalarına devam edilmesi olası etkilerinin azaltılması için önemlidir.

Kaynakça

- AFAD. (2021) *Biyolojik Silahların Tarihçesi*.
- Al-ani FK, ve Roberson J. (2007) Glanders in horses : A review of the literature. *Veterinarski Arhiv*, 77(3), 203–218.
- Allan D, ve Dance B. (2009) Melioidosis and Glanders as Possible Biological Weapons. In I. W. Fong ve K. Alibek (Eds.), *Bioterrorism and Infectious Agents: A New Dilemma for the 21st Century*, 99–129.
- Alp, E. ve Doğanay M. (2006) Biyoterörizm. *Yoğun Bakım Dergisi*, 6(3), 135–146.
- Arizona Department of Health Services. (2004) *Glanders: Bioterrorism Agent Profiles for Health Care Workers Office of Public Health*, 23–26.
- Arun S, Neubauer H, Gurel A, Awildiz G, Kussu B, Yesildere T, Meyer H, ve Hermanns W. (1999) Equine glanders in Turkey. *Veterinary Record*, 1999(144), 255–258. <https://doi.org/10.1136/vr.144.10.255>
- Baker SM, Davitt CJH, Motyka N, Kikendall NL, Russell-Lodrigue K, Roy CJ, ve Morici L A. (2017) A Burkholderia pseudomallei Outer Membrane Vesicle Vaccine Provides Cross Protection against Inhalational Glanders in Mice and Non-Human Primates. *Vaccines*, 5(49), 1–17. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040049>
- Bossi P, Tegnell A, Baka A, Loock F Van, Hendriks J, Werner A, Maidhof H, ve Gouvras G. (2004) Bichat Guidelines For The Clinical Management Of Glanders And Melioidosis And Bioterrorism-Related Glanders And Melioidosis. *Eurosurveillance*, 9(12), 1–6.
- CDC. (2021) *Bioterrorism Agents/Diseases*. Erişim: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> Erişim Tarihi: 24.05.2021
- Cumhuriyet Gazetesi Arşivi.pdf. (1983) 13.12.1983 tarihli Cumhuriyet Gazetesi, 11.
- Curling CA, Burr JK, Hebner MC, Lavolet LA, Lee PJ, ve Bishop KA. (2010) Glanders. In *Parameters for Estimation of Casualties from Exposure to Specified Biological Agents: Brucellosis, Glanders, Q Fever, SEB and Tularemia*, 51–66.
- Doğanay M, Yılmaz E, Topluoğlu S, Şahin M, Diker KS, Akçay E, Aktaş D, Yılmaz K, Kılıç S, Köşker İ, Yumrutaş M, Kara F, ve Meşe EA. (2020) Ruam değerlendirme raporu. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77(Ek-1), 1–24.
- Jamooli S, Mosavari N, ve Asmar M. (2016) Evaluation of indirect immunofluorescence assay for the diagnosis of bacterial agent of glanders. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 10(3), 1–10.
- Jones MH. (1992) Wickham steed and German biological warfare research. *Intelligence and National Security*, 7(4), 379–402. <https://doi.org/10.1080/02684529208432176>
- Júnior EL dos S, Moura J de CR, Protásio BKPF, Parente VAS, ve Veiga MHND. (2020) Case Report Clinical repercussions of Glanders (*Burkholderia mallei* infection) in a Brazilian child : a case report. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 53(e20200054), 1–3. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0054-2020>

- Khakhum N, Tapia D, ve Torres AG. (2019) Burkholderia mallei and Glanders Nittaya. In S. K. Singh ve J. H. Kuhn (Eds.), *Defense Against Biological Attacks Volumell*, 161–183.
- Khan AW, Kotta S, Ansar, SH, Sharma RK, Kumar V, Rana S, ve Ali J. (2012) Chemical, biological, radiological, and nuclear threats-Decontamination technologies and recent patents: A review. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 4(012704), 1–16. <https://doi.org/10.1063/1.3688029>
- Oliveira M, Mason-buck G, Ballard D, Branicki W ve Amorim A. (2020) Biowarfare , bioterrorism and biocrime : A historical overview on microbial harmful applications. *Forensic Science International Journal*, 314(2020), 110366. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110366>
- Pakdemirli A. (2021) Biyoavunmada aşı üretim teknolojileri ve çift kullanım. In N. Duran ve M. O. Donbaloğlu (Eds.), *Sağlık Bilimlerinde Yeni Yaklaşımlar* Livre de Lyon, 1–10.
- Sathua K ve Flora SJS. (2020) Bacterial biological warfare agents. In S. J. . Flora ve V. Pachauri (Eds.), *Handbook on Biological Warfare Preparedness*, Elsevier,13–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812026-2.00002-5>
- Saxena A ve Pal V. (2019) Development of a rapid and sensitive recombinase polymerase amplification - lateral flow assay for detection of Burkholderia mallei. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66, 1016–1022. <https://doi.org/10.1111/tbed.13126>
- Silva EB ve Dow SW. (2013) Devolpment of Burkholderia mallei and pseudomallei vaccines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00010>
- Tegnell A, Loock F Van, Baka A, Wallyn S, Hendriks J, Werner A ve Gouvras G. (2006) Development of a matrix to evaluate the threat of biological agents used for bioterrorism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(2006), 2223–2228. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6310-5>
- Titball, R. W., Burtnick, M. N., Bancroft, G. J., ve Brett, P. (2017) Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei vaccines : Are we close to clinical trials ? *Vaccine*, 35(44), 5981–5989. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.022>
- Torba TA. (2020) Burkholderia mallei: ruam hastalığı. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi*, 5(2), 353–361.
- Uçar N. (1960) Memleketimizde insanlarda tesbit edilen ruam vak'aları. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1), 65–68.
- Whitlock GC, Estes DM ve Torres AG. (2007) Glanders: off to the races with Burkholderia mallei. *FEMS Microbiol Lett*, 277(2007), 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00949.x>
- Zakharova I, Teteryatnikova N, Toporkov A ve Viktorov D. (2017) Acta Tropica Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Burkholderia thailandensis, and Burkholderia cepacia complex. *Acta Tropica*, 174(February), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.016>
- Zandt KE Van, Greer MT ve Gelhaus HC. (2013) Glanders : an overview of infection in humans. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(131), 1–7.



Viral enfeksiyonlar ile mücadelede en hızlı silahlardan biri: antiserum/plazma tedavisi

Bahattin Taylan Koç^{1*}, Kadir Serdar Diker²

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye
² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 14.06.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 06.10.2021

Özet: SARS-CoV-2'nin neden olduğu COVID-19 pandemisi, bulunduğumuz zaman diliminde hızla dünya popülasyonu arasında yayılmaya devam etmektedir. 2020 yılı ve 2021 yılı başlarında ortaya çıkan yeni mutant ve varyantlar virusa karşı mücadelede handikaplar yaratmaktadır. Özellikle akut enfekte olan bireylerde tedavi için acil olarak kullanılan ilaçların tam olarak standardize edilememesi bilim dünyasını COVID-19, ve gelecekteki muhtemel salgınlar için arayışlara yöneltmektedir. Bu araştırmalarda tarihte elde edilen kanıtlara ve verilere dayalı olarak bazı uygulamalar ön plana çıkmaktadır. Bu uygulamalardan en çok bilineni ve tarihte hemen her virus salgınında acil olarak tedavide kullanılan yöntem "antiserum" ya da konvelesan plazma tedavisidir. Geleneksel yöntem antiserum-plazma tedavisi başta olmak üzere antikör bazlı yeni nesil ilaçlar geçmişteki salgınlarda ve COVID-19 pandemisinde kullanımları, elde edilen sonuçlar bu makalede derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antiserum, COVID-19, Plazma, SARS-CoV-2, Virus

One of the fastest weapons in fighting viral infections: antiserum/plasma therapy

Abstract: The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 continues to spread rapidly among the world population in the current period. New mutants and variants that emerged in 2020 and early 2021 create handicaps in the fight against the virus. The inability to fully standardize the drugs used urgently for treatment, especially in acutely infected individuals, led the scientific world to novel investigation for COVID-19, and potential epidemics in the future. In these studies, some applications come to the fore based on the evidence and data obtained in history. The most well-known of these applications and the method used in the emergency treatment of almost every virus epidemic in history is "antiserum" or "convalescent plasma therapy". The use of antibody-based new generation drugs, especially the traditional method antiserum-plasma therapy, in past epidemics and the COVID-19 pandemic, and the results obtained are compiled in this article.

Keywords: Antiserum, COVID-19, Plasma, SARS-CoV-2, Virus

Giriş

"Antiserum Tedavisi" ya da "Plazma Tedavisi" tarihte birçok hastalıkla mücadelede başarı ile kullanılmış ve halen birçok hastalıkta ilk akla gelen acil tedavi seçeneklerinden biri olarak düşünülen pasif bağışıklık yöntemidir. "Antikör Tedavisi" veya "Pasif İmmünizasyon" olarak da adlandırılan bu tedavi, günümüzde COVID-19 pandemisi ile tekrar gündeme gelmiş ve iyileşen hastalardan alınan serumlar ile birçok hasta tedavi edilebilmiştir. Tarihte birçok farklı hastalık etkenine karşı kullanılan bu metot, bilimsel yeni ürünlerin (farklı aşı çeşitleri, gen terapisi, vs.) çıkmasıyla sürekli arka planda tutulmuş ve gereken önem verilememiştir. Bu yüzden bu tedavi seçeneği gerekli düzeyde geliştirilememiş ve modifiye edilememiştir. Günümüzde halen bazı hastalıklarda kullanılması ve özellikle COVID-19 pandemisinde başarılı bir tedavi

seçeneği oluşturmasından dolayı araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Aşıda da olduğu gibi bu tedavi seçeneğinin de yeni nesil ilaç boyutuna taşınması için bilimsel çalışmalar giderek artmaktadır. Bu doğrultuda geçmişin geleceğe ışık tutması perspektifiyle özellikle virüslere karşı tarihte uygulanan antiserum ve uygulama metotları bu derlemede konu edilmiştir.

Tarihte bilinen ilk antiserum uygulamaları, 19'uncu yüzyılın sonlarına doğru von Behring ve Kitasato (1891) tarafından *Corynebacterium diphtheriae* ve *Clostridium tetani* etkenlerine karşı yapılmıştır. von Behring ve Kitasato (1891), söz konusu bakterilere ait toksinleri atlara vererek immünserum elde etmiştir. von Behring bu çalışması ile 1901 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür. Antiserum ile yapılan bu ilk çalışmanın ardından 20. yüzyılda sağ-

lık-tıp alanında immün sistem ve elemanları üzerine çalışmalar hızla artmıştır. Özellikle Alman bilim insanı Paul Erlich immün sistem üzerine yaptığı çalışmalardan sonra ilk defa humoral bağışıklığı tanımlamıştır. Paul Erlich de bu keşfi ile 1908 yılında Nobel ödülü almıştır (Lindeman 1984). 1900'lü yılların başında immün sistem etmenleri ve bunlarla ilişkili medikal uygulamalar hakkında yapılan yoğun bilimsel çalışmalar, o zamanın koşulları için acil olarak tedavi ve/veya korunma seçeneği olarak insanlar için sunulmuştur. Bu doğrultuda söz konusu bilim insanları ve daha pek çoğu ticari olarak antiserum üretimi sağlayıp, tedavide kullanılması için piyasaya sürülmesine aracılık etmiştir (Hey 2015). Ancak o günün koşullarında etik koşulların tam anlamıyla sağlanamaması nedeniyle özellikle çapraz tür uygulamalarında istenmeyen sonuçlar ortaya çıkmıştır. 1902 senesinde "Jim" adlı bir attan elde edilen anti-difteri serumunun tetani toksini ile kontamine olması sonucu, uygulanan 13 çocuğun ölümüne neden olmuştur. Bu olay büyük trajedi yaratsa da 1906 yılında biyolojik ürünlerin sıkı denetimi için Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)'nin kurulması ile sonuçlanan bir süreci başlatmıştır (Anonim 2018). Bu sayede yeni üretilen ilaçların yaygın kullanımından önce çeşitli kontrollerden geçerek kullanımının uygun olup olmadığının belirlenmesi sağlanmıştır (Anonim 2018). Antiserum, o dönem için farklı hastalıklara karşı atlar dışında köpek, koyun, keçi, sığır gibi hayvanlarda da üretilip kullanıma sunulmuştur.



Şekil 1. 1902 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde anti-difteri serumu üretmek için kullanılan at "Jim" (Bren 2006)

1918 yılında ortaya çıkan ve dünya popülasyonunun nerdeyse dörtte birini hasta eden İspanyol gribi pandemisine kadar antiserum uygulamaları genellikle heterolog olup, insanda çapraz reaktif antikorlar yoluyla immunizasyon sağlanmıştır.

Heterolog serum uygulamalarında görülen yüksek yan etki, sınırlı uygulama, zor üretilme, her etken için farklı bağışıklık gelişimi gibi engeller, 1918 yılındaki grip salgınıyla birleşmesi sonucu farklı metotların ve tekniklerin araştırılmasına yol açmıştır. Grip salgınının çok hızlı ilerlemesi ve iyileşen bireylerde nötralizan antikor varlığının bilinmesi bilim insanlarını hızlı bir pasif bağışıklık sağlayabilecek bir tedavi seçeneği olan homolog (iyileşen bireyden alınan serumun hasta bireye transfüzyon yoluyla verilmesi) antiserum tedavisine (konvelesan plazma) yönlendirmiştir (Garraud ve ark 2016).

Ancak 1928 yılında Alexander Fleming'in penisilin keşfi sonrası özellikle bakteriyel hastalıklarda antibiyotiklerin kullanılmasıyla antiserumun geniş kullanımı ve geliştirilmesini uzun bir süre sekteye uğramıştır. Benzer şekilde hücre kültürü kullanılması sonucu birçok viral hastalık için aşı geliştirilebilmesi, viral hastalıkların birçoğu için antiserum kullanımının neredeyse tamamen terkedilmesine yol açmıştır. Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte moleküler araştırmalar artmış ve serum içinde bulunan spesifik antikorların elde edilmesi sağlanmıştır. Bu tedavi biçimi daha çok monoklonal antikor elde edilmesini temel almaktadır. Söz konusu tedavi tipine, antikor-temelli terapi (antibody-based therapy) de denilmektedir. Antikor-temelli terapi son 30 yılda oldukça gelişmiş olup birçok firma ticari ürün olarak piyasaya sürmüştür. Bu ürünlerin enfeksiyöz hastalıklardan ziyade, daha yoğun olarak onkoloji ve otoimmün hastalıklarda kullanılması söz konusu ilaçların geliştirilmesinin bu yönlü deplase olmasına neden olmuştur. Ticari monoklonal antikorların içinden Palivizumab (Synagis) isimli ilaç insanlarda görülen Respiratorik Sinsityal Virus (RSV) enfeksiyonuna karşı insan serumundan üretilen bir immunglobulin G1 (IgG1) olup, 1998 senesinde FDA tarafından kullanımı onaylanmıştır. Palivizumab, bir virusa karşı ticari olarak üretilmiş ilk antikordur. Palivizumab, günümüzde bir yaştan küçük neonatal predispozisyonlu bebeklerin (preterm) RSV profilaksisinde kullanılmaktadır (Anonim 2018a).

Enfeksiyon hastalıklarında her ne kadar antiserum uygulamalarının yerine spesifik ve hedef odaklı antikor terapisi teorik anlamda daha olumlu olarak görülse de bunun klinik bakımından pratiğe uygulanması halen oldukça zordur. Özellikle yeni ortaya çıkan ve kolay mutasyona uğrayan viruslara karşı

monoklonal antikorların üretilmesi, purifiye edilmesi, standardize edilmesi söz konusu enfeksiyonun klinik sürecine yetiştirilmesinde belli bir zaman periyoduna ve güvenilirlik testlerine ihtiyaç vardır. Bu amaçla yeni ortaya çıkan virus ya da bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için "Antikor Kokteyli" uygulaması denenmektedir. Buna göre önceden bir antijene spesifik üretilmiş monoklonal ya da poliklonal antikorların yeni enfeksiyona yol açan bir etken-deki antijene çapraz reaksiyonla etkili olabileceğini düşünerek deneysel karışım halinde kullanılmalıdır. Ayrıca salgınların görüldüğü zaman dilimi çerçevesinde söz konusu virüsler veya antijenik epitoplara karşı üretilen spesifik antikorların karışık şekilde kullanılması da "Antikor Kokteyli" tedavisine girmektedir. Roche ve Regeneron firmalarının ürettiği antikor kokteyli farklı monoklonal antikorlar (REGEN-COV; casirimivab/imdevimab) içermekte olup, COVID-19 pandemisi için acil kullanıma sunulmuştur (Anonim 2020). Özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde uygulanan antikor kokteyli, başarılı sonuçlar alınmasından sonra diğer ülkelerde de kullanılmaya

başlanmıştır (Anonim 2020). Amerika Birleşik Devletleri Eski Başkanı Donald Trump'ın da COVID-19 ile enfekte olduğu tespit edildiğinde söz konusu antikor kokteyli ve Remdesivir adlı antiviral ilacı kombine olarak kullandığı ve hızla sağlığına kavuştuğu rapor edilmiştir (Anonim 2020). Yine Eli Lilly firmasının ürettiği LY-CoV555 (Bamlanivimab) ve LY-CoV016 (Bamlanivimab/Etesevimab) ticari isimli antikor kokteylleri de 2020 yılı içinde FDA tarafından acil kullanım onayı almıştır. Ancak yapılan klinik çalışmalar sonucunda SARS-CoV-2'nin farklı varyantlarını istenilen düzeyde nötralize edememesinden dolayı 25 Nisan 2021'de FDA LY-CoV555 (Bamlanivimab)'in acil kullanım onayını geri çekmiştir (FDA 2021). Celltrion firmasının ürettiği CT-P/059 ticari isimli Regdanvimab monoklonal antikorunu SARS-CoV-2'ye ait "spike (S)" proteininin receptor-binding-domain (RBD)'ini nötralize etmektedir (Anonim 2021). Son yapılan çalışmalarda CT-P/059'un SARS-CoV-2'nin farklı varyantlarının başarılı bir şekilde nötralize edebildiği rapor edilmiştir (Anonim 2021).

Tablo 1. SARS-CoV-2 tedavisi için klinik deneme aşamasında olan ya da acil kullanım onayı almış öne çıkan monoklonal antikorlar ve antikor kokteylleri

Firma	Ticari isim	Monoklonal Antikorlar	Durumu
Regeneron-Roche	REGEN-COV	Casirimivab/Imdevimab	Acil Kullanım Onayı (EUA)*
Eli Lilly	LY-CoV016	Bamlanivimab/Etesevimab	Acil Kullanım Onayı (EUA)*
Eli Lilly	LY-CoV555	Bamlanivimab	Faz 3
Celltrion	CT-P/59	Regdanvimab	Faz3

*Emergency Use Authorization (EUA): Acil Kullanım Onayı (FDA tarafından)

Günümüzde antiserumun kullanımı geçmişe göre sınırlı olup, daha çok omurgasız eklem bacaklılar (akrep), sürüngen (yılan), vs. zehirlenmeleri için yaygın olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır. Her ne kadar aşısı geliştirilmiş olsa da bazı enfeksiyöz hastalıklarda da hızlı bir pasif bağışıklık sağlanması için antiserum kullanımına devam edilmektedir. Uygulanmaları vaka durumuna ve hekim değerlendirilmesine göre yapılmaktadır. Bu enfeksiyonların başında bakteriyel olarak *Clostridium tetani*, viral olarak ise Kuduz (Rabies) gelmektedir. Özellikle kuduz virusu ile enfekte olduğu kesin olarak bilinen bir hayvanın (genellikle köpek ya da vahşi hayvanlar) bu virüsü bir insana ya da hayvana bulaştırması sonucu immunizasyon ivedilikle oluşturulması bakımından antiserum uygulanması yapılmaktadır (Anonim 2017). 1975 yılından bu yana yapılan homolog kuduz antiserum tedavisi ile ABD'de 250 bin kişi sağlığına kavuşmuştur. Bu tedavi sonrası herhangi bir yan etki rapor edilmemiştir (Anonim 2017). Çok ter-

cih edilmese de kuduz virusuna karşı tek tırnaklılara ait heterolog antiserumla da tedavi seçeneği mevcuttur (Anonim 2017). Özellikle heterolog antirabies serumun gelişmemiş ve az gelişmiş ülkelerde düşük maliyeti ve kolay ulaşılabiliirliğinden dolayı günümüzde kullanımı mevcuttur (Anonim 2017). Ancak günümüzde kuduz aşısı oldukça iyi bir immunstimulasyon sağlamasından dolayı bu uygulama gelişmiş ülkelerde çok tercih edilmemektedir.

Tarihsel olarak viral hastalıklarda antiserum tedavisi (homolog) ve antikor terapisine baktığımızda, aslında uygulanmalarında iki farklı strateji ortaya çıkmaktadır. Antiserum tedavisi tarihte geniş kitleleri etkileyen virus salgınlarında mortalite oranını düşürmek amacıyla acil olarak kullanılan bir yöntem iken, antikor terapisi mutasyon dinamiği çok düşük veya konakta latent/kronik enfeksiyona neden olan virüslerin tedavisinde tercih edilen yöntem olmuştur. Süreç açısından değerlendirildiğinde halen antiserum uygulaması viral hastalıklarda ilk akla gelen acil

tedavi seçeneklerinden biridir (Joyner ve ark. 2020; Montelongo-Jauregui ve ark. 2020).

Antiserum uygulaması COVID-19 pandemi-sinde de ilk akla gelen tedavi seçeneklerinden biri olmuştur. Özellikle iyileşen hastalardan alınan serumlar hastanede yatan hastalara acil olarak uygulanmıştır. 16 Mayıs 2021 tarihi itibarıyla ise Birleşik Devletler Ulusal Sağlık Enstitüsü (U.S. NIH)'ne ait Klinik Denemeler takip sistemi (ClinicalTrials.gov)'nde COVID-19'a karşı uygulanan plazma tedavisi bazlı klinik denemelerin sayısı 216'dır. Bu denemelerin üç adedi Türkiye'den olup halen devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2021'in ilk ayları itibarıyla sağlık kurumlarında COVID-19'a karşı plazma uygulaması aylık olarak 100 binin üzerindedir. Yaklaşık bir buçuk yıllık sürede (Ocak 2020-Haziran 2021) PubMed ve MEDLINE veritabanlarından toplanan COVID-19 'a karşı randomize plazma terapisi verilerine göre bu terapi yönteminin toplamda mortalite oranının %42 oranında azalttığı ortaya konmuştur (Klassen ve ark. 2021). Bu sonuç, antiserum uygulamalarının acil kullanımda mortalite oranlarını ne ölçüde düşürebileceğini kanıtlamıştır.

COVID-19 pandemisinde olduğu gibi SARS-CoV-1 ve MERS-CoV'un neden olduğu salgınlarda da çeşitli antiserum uygulamaları yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar COVID-19 salgınında uygulanan kadar sistematik ve randomize olmamasına karşın günümüzdeki antiserum uygulamaları için önemli katkılar sağlamıştır. 2003 yılında 3 aylık bir periyotta (Mart-Nisan-Mayıs 2003) Hong Kong'da SARS-CoV-1'e karşı 80 hastada iyileşen hastalardan alınan antiserum uygulaması yapılmıştır. Uygulanan bu tedavi sonucunda toplam mortalite oranının %17'den %12,5'a düştüğü gözlemlenmiştir (Cheng ve ark. 2005). 2015 yılında MERS-CoV salgınında Suudi Arabistan'da konvelesan plazma tedavisi yaygın olarak kullanılmıştır. Özellikle sürekli maruziyet altında olan sağlık çalışanları için yapılan bu tedavi ile hayatta kalma oranının arttığı rapor edilmiştir (Arabi ve ark. 2015). Ayrıca MERS-CoV için antikor kokteyl tedavisi de uygulanmıştır. SARS-CoV-2 için de antikor kokteyl tasarlayan Regeneron firması MERS-CoV'a karşı REGN3048 ve REGN3051 ticari isimli iki monoklonal antikor üretmiş ve 2018'de klinik denemelerine başlamıştır (Sivapalasingam ve ark 2021). Klinik denemelerde deney hayvanları üzerinde tedavi çalışmalarını mevcut olsa da insanlarda sadece profilaktik amaçla bir çalışma yapılmıştır (Sivapalasingam ve ark 2021). Söz konusu çalışmada 48 gönüllü bireye iki gün arayla yapılan transfüzyonel uygulamalar ile 12 plaseboya karşı 36 bireyde MERS-CoV'a karşı

yüksek titrede IgG varlığı rapor edilmiştir (Sivapalasingam ve ark 2021).

Geçmiş yıllarda önemli viral solunum sistemi hastalıklarına karşı uygulanan antiserum ya da konvelesan plazma tedavilerine ait meta-veri analizleri yapılmıştır. Mair-Jenkins ve ark. (2015) yaptıkları meta analiz çalışmasında dört farklı solunum yolu sistemi virusunun konvelesan plazma ile tedavi sonuçlarını rapor etmiştir. İspanyol gribi adıyla bilinen influenza virus H1N1'in neden olduğu pandemi dünya nüfusunun üçte birini etkilemiş ve 50 milyon insanın hayatını kaybetmesine neden olmuştur (Mair-Jenkins ve ark 2015). Konvelesan plazma tedavisi o dönemde yeni uygulanan bir tedavi seçeneği olmasından ötürü birçok gözlemsel ve deneysel çalışma yapılmıştır (Mair-Jenkins ve ark 2015). Özellikle o dönem ayrıntılı olarak raporlanan iki çalışmada vaka ölüm oranlarının birinde %19 diğerinde ise %22 azaldığı belirtilmiştir (Gould 1919; Kahn 1919). O'Malley ve Hartman (1919) yaptığı çalışmada da ölüm vaka oranının plazma tedavisiyle %30'a yakın bir oranda azaldığı belirtilmiştir. Bu çalışmaların ardından Lesne ve ark. (1919) yapılan klinik uygulamalar sonucu plazma tedavisinin vaka ölüm oranının %50 azaldığını rapor etmiştir.

Avian influenza (Kuş Gribi) olarak bilinen zoonotik karakterli H5N1 influenza virusu neden olduğu 2003 yılındaki salgında da hastalar üzerinde plazma tedavisi uygulanmış ancak antiviral bir ilaç olan oseltamivir'in vakalarda iyi yanıt verdiği rapor edilmesinden dolayı uygulanması sınırlı kalmıştır. Plazma tedavisi uygulanan farklı vaka olgularında genellikle başarılı olduğu ancak yeterli düzeyde nötralizan antikor sağlanamadığı belirtilmiştir (Kong ve Zhou 2006). Ayrıca "domuz gribi" ya da "H1N1 influenza virusu" 2009 salgısını sırasında da antiserum/plazma tedavisi gündeme gelmiş ancak "oseltamivir" isimli antiviral oral olarak kullanılması klinik olarak daha pratik olmasından dolayı söz konusu pandemide daha ön plana çıkmıştır (Skarbinski ve ark 2011). Bir nöroaminidaz reseptör blokörü olan oseltamivir o dönemden bu yana farklı influenza salgınlarında tedavi için antiviral ilaç olarak kullanılmış ve halen kullanılmaktadır (CDC 2021). Ancak konvelesan plazma ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda mortalite düşürme açısından herhangi bir fark saptanamamıştır. Hatta bazı çalışmalarda "oseltamivir"e ait yüksek yan-etki görüldüğü ve nöroaminidaz inhibitörüne resistanslı suşlara etki etmediği rapor edilmiştir (Luke ve ark 2010; Moore ve ark 2011; Pizzorno ve ark 2011).

2014-2015 yıllarında Afrika kıtası başta olmak üzere dünyanın birçok yerinde görülen Ebola virus

salgınlarında diğer virus salgınlarında olduğu gibi konvelesan plazma terapisi uygulanmıştır. Batı Afrika'da van Griensven ve ark (2016)'nın yaptığı çalışmada konvelesan plazma bir grup Ebola hastası ile farklı ilaçlar uygulanan bir başka grubu karşılaştırmışlardır. Buna göre konvelesan plazma uygulanan grupta mortalite oranı %31 iken kontrol grubunda bu oran %38 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada en dikkat çeken sonuç ise, plazma tedavisi gören beş yaş altındaki çocukların hepsinin iyileşmiş olmasıdır. van Griensven ve ark. (2016) bu sonucu transfüzyonel bazlı uygulamanın çocuklarda daha başarılı olabileceğini tartışmışlardır.

Ebola, influenza, hepatitis C gibi virüslere karşı halihazırda tasarlanmış ve üretilmiş monoklonal antikorlar mevcuttur. Ancak bu monoklonal antikorlar genel olarak güvenilirlik klinik deneme düzeylerinde olup birçoğu faz-1 deneme sürecine ulaşamamıştır (Pelegri ve ark. 2015).

Veteriner hekimlikte bazı virüslere karşı antiserum/plazma tedavisi yapılmıştır. Özellikle parvovirusların neden olduğu canine parvovirus (CPV) ve feline panleukopenia (FPV) enfeksiyonlarına karşı pasif immunizasyon amacıyla uygulanmış ve ticari olarak kullanıma sunulmuştur (Gerlach ver ark 2017). IDT Biologika firması tarafından üretilen Stagloban SHP isimli hiperimmun serum CPV ve canine adenovirus tip 1 (CAV-1)'e karşı immunglobulinleri içermekte olup yaklaşık 15 sene Almanya'da pasif immunizasyonda kullanılmış ancak daha sonra üretimine devam edilmemiştir. Bunun aksine kedilerde görülen FPV'ye karşı üretilen antiserum günümüzde kullanımdadır. Feliserin Plus isimli bu hiperimmun serum köpeklerde de profilaktik amaçla kullanılabilir. Atlardan elde edilen bu hiperimmun serum içerisinde FPV'nin yanı sıra feline calicivirus (FCV) ve feline herpesvirus tip 1 (FHV-1)'e karşı da immunglobulinler içermektedir. Almanya günümüzde kullanımda olan bu terapötik, diğer Avrupa Birliği ülkelerinde yasal izinlerle kullanılabilir (Gerlach ver ark 2017).

Sonuç

Antiserum (plazma) uygulamalarında en sık görülen yan etki transfüzyona bağlı gelişen yan etkilerdir. Bunlardan en önemlisi ve sık gelişenleri transfüzyona bağlı akciğer hasarı (transfusion related acute lung injury; TRALI) ve transfüzyona bağlı sirkülasyona aşırı yüklenme (transfusion associated circulatory overload; TACO)'dur (Koç 2020). Bunların yanında daha az görülen transfüzyon sonrası antikora bağlı enfeksiyon artışı (antibody dependent enhance-

ment; ADE) şekillenebilmektedir (Koç 2020). Daha nadir görülmeyle beraber aşırı duyarlılık reaksiyonları, aşırı alerjik yanıt, şok gibi yaşamsal risk yaratan klinik görünüm de ortaya çıkabilmektedir (Koç 2020). Bu istenmeyen etkileri aşıp daha etkin ve hızlı terapi sağlayabilmek için monoklonal antikor kullanımını günümüzde ön plana çıkarmıştır. Ancak bu tip terapinin de zaman, maliyet, standardizasyon ve uygulama hız düşüklüğü bakımından handikaplar içermesinden ötürü acil pasif bağışıklığın sağlanması ve bir an önce mortalite oranlarının azaltılabilmesi açısından halen "antiserum" veya "konvelesan plazma" ön plana çıkmaktadır. Bu tekniklerin günümüzde yapılacak olan yeni çalışmalarla geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun sağlanması halinde önemli bir acil tedavi seçeneği olabilecektir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir ve deney hayvanları etik kurulu iznine gerek yoktur.

Kaynaklar

- Anonim (2017) WHO, World Health Organization. Other rabies biological products. Erişim adres: https://www.who.int/rabies/resources/other_rabies_biological_product/en/, Erişim tarihi: 14.05.2021
- Anonim. (2018) FDA, Science and the regulation of biological products. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/about-fda/histories-product-regulation/science-and-regulation-biological-products>, Erişim tarihi: 08.05.2021
- Anonim. (2018a) Türk Neonatoloji Derneği Palivizumab ile RSV Profilaksisi Önerileri. Erişim adresi: <http://www.neonatology.org.tr/wp-content/uploads/2020/04/TND-PalivizumabileRSVProfilaksisiOnerileri-2018.pdf>, Erişim tarihi: 12.05.2021
- Anonim. (2020) BBC News: Dexamethasone, remdesivir, Regeneron: Trump's Covid treatment explained. Erişim adresi: <https://www.bbc.com/news/health-54418464>, Erişim tarihi: 11.05.2021
- Anonim. (2021) Clinical Trials Arena. Celltrion's regdanvimab neutralises South African Covid-19 variant. Erişim adresi: <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/celltrion-regdanvimab-south-african-variant/>, Erişim tarihi: 10.05.2021
- Arabi Y, Balkhy H, Hajeer AH, Bouchama A, Hayden FG, Al-Omari A, Al-Hameed FM, Taha Y, Shindo N, Whitehead J, et al. (2015) Feasibility, safety, clinical, and laboratory effects of convalescent plasma therapy for patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a study protocol. Springerplus. 4, 709. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-015-1490-9>.
- Bren L. (2006) The road to the biotech revolution: highlights of 100 years of biologics regulation. *FDA Consum.* 40, 50-57.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2021) Influenza; Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm#overview>, Erişim tarihi: 15.05.2021

- Cheng FWT, Ng PC, Chiu WK, Chu WCW, Li AM, Lo KL, Hon EKL, Nelson EAS, Leung TF, Ng WH, et al. (2005) A case-control study of SARS versus community acquired pneumonia. *Arch Dis Child*. 90, 747–749. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2004.063446>.
- FDA U.S. Food and Drug Administration (2021) Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Revokes Emergency Use Authorization for Monoclonal Antibody Bamlanivimab. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-revokes-emergency-use-authorization-monoclonal-antibody-bamlanivimab>, Erişim tarihi: 12.05.2021
- Garraud O, Heshmati F, Pozzetto B, Lefrere F, Girot R, Saillol A, Laperche S. (2016) Plasma therapy against infectious pathogens, as of yesterday, today and tomorrow. *Transfus Clin Biol*. 23, 39–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2015.12.003>.
- Gerlach M, Proksch AL, Unterer S, Speck S, Truyen U, Hartmann K. (2017) Efficacy of feline anti-parvovirus antibodies in the treatment of canine parvovirus infection. *J Small Anim Pract*. 58, 408–415. <http://dx.doi.org/10.1111/jsap.12676>.
- Gould EW. (1919) Human serum in the treatment of influenza bronchopneumonia. *N Y Med J*. 109, 666–667.
- Hey A. (2015) History and practice: Antibodies in infectious diseases. *Microbiol Spectr*. 3, AID-0026-2014. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0026-2014>.
- Joyner M, Wright RS, Fairweather D, Senefeld J, Bruno K, Klassen S, Carter R, Klompas A, Wiggins C, Shepherd JR, et al. (2020) Early safety indicators of COVID-19 convalescent plasma in 5,000 patients. *J Clin Invest*. 130, 4791–4797. <https://doi.org/10.1172/JCI140200>.
- Kahn MH. (1919) Serum treatment of postinfluenzal bronchopneumonia. *J Am Med Assoc*. 72, 102–103.
- Klassen SA, Senefeld JW, Johnson PW, Carter RE, Wiggins CC, Shoham S, Grossman BJ, Henderson JP, Musser J, Salazar E, et al. (2021) The effect of convalescent plasma therapy on mortality among patients with COVID-19: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 96, 1262–1275. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.02.008>.
- Koç BT. (2020) Current clinical trials and vaccine development. *Eurasian J Vet Sci*, COVID-19 Special Issue, 91-98. <http://dx.doi.org/10.15312/EurasianJVetSci.2020.299>.
- Kong LK, Zhou BP. (2006) Successful treatment of avian influenza with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*. 12, 489. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148811>.
- Lesne E, Brodin P, Saint-Girons F. (1919) Plasma therapy in influenza. *Presse Med*. 27, 181–182.
- Lindenmann J. (1984) Origin of the terms “antibody” and “antigen.” *Scand J Immunol*. 19, 281–285.
- Luke TC, Casadevall A, Watowich SJ, Hoffman SL, Beigel JH, Burgess TH. (2010) Hark back: passive immunotherapy for influenza and other serious infections. *Crit Care Med*. 38, 66–73. <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e>.
- Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw F-M, Lim WS, Makki S, Rooney KD, Nguyen-Van-Tam JS, Beck CR, et al. (2015) The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis*. 211, 80–90.
- Montelongo-Jauregui D, Vila T, Sultan AS, Jabra-Rizk MA. (2020) Convalescent serum therapy for COVID-19: A 19th century remedy for a 21st century disease. *PLoS Pathog*. 16, e1008735. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008735>.
- Moore C, Galiano M, Lackenby A, Abdelrahman T, Barnes R, Evans MR, Fegan C, Froude S, Hastings M, Knapper S, et al. (2011) Evidence of person-to-person transmission of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus in a hematology unit. *J Infect Dis*. 203, 18–24. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq007>.
- O'Malley J, Hartman F. (1919) Treatment of influenzal pneumonia with plasma of convalescent patients. *J Am Med Assoc*. 72, 34–37.
- Pelegrin M, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M. (2015) Antiviral monoclonal antibodies: Can they be more than simple neutralizing agents? *Trends Microbiol*. 23, 653–665. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.005>.
- Pizzorno A, Bouhy X, Abed Y, Boivin G. (2011) Generation and characterization of recombinant pandemic influenza A(H1N1) viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *J Infect Dis*. 203, 25–31. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq010>.
- Sivapalasingam S, Saviolakis GA, Kulcsar K, Nakamura A, Conrad T, Hassanein M, Sumner G, Elango C, Kamal MA, Eng S, et al. (2021) Human monoclonal antibody cocktail for the treatment or prophylaxis of Middle Eastern Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). *J Infect Dis*. jia036. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jia036>.
- Skarbinski J, Jain S, Bramley A, Lee EJ, Huang J, Kirschke D, Stone A, Wedlake T, Richards SM, Page S, et al. (2011) Hospitalized patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in the United States--September-October 2009. *Clin Infect Dis*. 52, 50-59. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciq021>.
- Van Griensven J, Edwards T, Baize S, Ebola-Tx Consortium. (2016) Efficacy of convalescent plasma in relation to dose of Ebola virus antibodies. *N Engl J Med*. 375, 2307–2309. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1609116>.
- Von Behring E, Kitasato S. (1991) The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890. *Mol Immunol*. 28, 1319–1320.