



ATATURK
UNIVERSITY
PUBLICATIONS

Veterinary Sciences *and Practices*

*Formerly: Atatürk University Journal of Veterinary Sciences
Official journal of Atatürk University Veterinary Sciences*

Volume 17 • Issue 1 • April 2022

Veterinary Sciences and Practices

Editor-in-Chief

Mustafa Sinan AKTAŞ

Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Associate Editors

Emin ŞENGÜL

Department of Physiology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Hakan AYDIN

Department of Virology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Murat GENÇ

Department of Zootechnics, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Uğur ÖZENTÜRK

Department of Zootechnics, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Technical Editors

Ekrem LAÇİN

Department of Zootechnics, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Foreign Language Services

M. Gökhan ŞENOCAK

Department of Surgery, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Advisory Board

Ardita JAHJA-HOXHA

Kosovo

Aleksandra GORECKA-BRUZDA

Department of Animal Behavior, Polish Academy of Sciences, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Warsaw, Poland

Daniel ZAHNER

Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

Eva VOŠLAROVA

Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Veterinary and Pharmaceutical Sciences University, Czech Republic

Mustafa ALIŞARLI

Department of Food Hygiene and Technology, Bolu Abant İzzet Baysal University, Faculty of Veterinary Medicine, Bolu, Turkey

Mustafa ATASEVER

Department of Food Hygiene and Technology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Tanvir RAHMAN

Department of Microbiology and Hygiene, Bangladesh Agricultural University, Bangladesh

Zekai HALICI

Department of Medical Pharmacology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey



Founder

İbrahim KARA

General Manager

Ali ŞAHİN

Publishing Director

Gökhan ÇİMEN

Editor

Hira Gizem FİDAN

Publications Coordinators

Defne DOĞAN
Vuslat TAŞ

Web Coordinator

Doğan ORUÇ

Finance Coordinator

Osman YALÇIN

Contact

Publisher: Atatürk University
Address: Atatürk University, Yakutiye,
Erzurum, Turkey

Publishing Service: AVES
Address: Büyükdere Cad., 105/9 34394 Şişli,
İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
E-mail: info@avesyayincilik.com
Webpage: www.avesyayincilik.com

Veterinary Sciences and Practices

AIMS AND SCOPE

Veterinary Sciences and Practices (Vet Sci Pract) is a scientific, open access, online-only periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is published triannually in April, October, and December. The publication languages of the journal are Turkish and English. The articles submitted in English will be given priority in evaluation.

Veterinary Sciences and Practices aims to contribute to the literature publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of veterinary medicine. The journal publishes original articles, invited reviews, case reports that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The scope of the journal includes but not limited to; basic and clinical veterinary sciences, raising livestock, veterinary genetics, animal nutrition and nutritional diseases, zoonoses, veterinary medicinal products and public health, and food hygiene, technology, exotic animal science and laboratory animal science.

The target audience of the journal includes specialists and professionals working and interested in all disciplines of veterinary medicine.

Veterinary Sciences and Practices currently indexed in Scopus, EBSCO, CABI, and TUBITAK ULAKBIM TR Index.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal is in conformity with the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Open Access Statement

Veterinary Sciences and Practices is an open access publication, and the journal's publication model is based on Budapest Access Initiative (BOAI) declaration. All published content is available online, free of charge at <https://veterinarysciences-ataunipress.org/>. Veterinary Sciences and Practices is content is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC) 4.0 International License which permits third parties to share and adapt the content for non-commercial purposes by giving the appropriate credit to the original work.

You can find the current version of the Instructions to Authors at <https://veterinarysciences-ataunipress.org/>.

Editor-in-Chief: Mustafa Sinan AKTAŞ

Address: Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Erzurum, Turkey

E-mail: vetdergisi@atauni.edu.tr

Publisher: Atatürk University

Address: Atatürk University, Yakutiye, Erzurum, Turkey

Publishing Service: AVES

Address: Büyükdere Cad., 105/9 34394 Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

E-mail: info@avesyayincilik.com

Webpage: www.avesyayincilik.com

Veterinary Sciences and Practices

AMAÇ VE KAPSAM

Veterinary Sciences and Practices (Vet Sci Pract), bağımsız, tarafsız ve çift-kör hakemlik ilkelerine uygun olarak yayınlanan, bilimsel, açık erişimli, yalnızca çevrimiçi bir süreli yayındır. Dergi yılda üç kez Nisan, Ekim ve Aralık aylarında yayımlanır. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir. İngilizce olarak gönderilen makalelere değerlendirilmede öncelik verilecektir.

Veteriner Bilimleri ve Uygulamaları, veteriner hekimliğin tüm alanlarında bilimsel olarak en üst düzeyde makaleler yayınlayarak literatüre katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Dergi, etik kurallara uygun olarak hazırlanmış özgün makaleler, davetli derlemeler, olgu sunumları yayınlar.

Derginin kapsamı bunlarla sınırlı olmamak üzere; temel ve klinik veterinerlik bilimleri, hayvancılık, veteriner genetiği, hayvan besleme ve beslenme hastalıkları, zoonozlar, veteriner tıbbi ürünler ve halk sağlığı ile gıda hijyeni, teknoloji, egzotik hayvan bilimi ve laboratuvar hayvanı bilimidir.

Derginin hedef kitlesi, veteriner hekimliğin tüm disiplinlerinde çalışan ve ilgilenen uzmanlar ve profesyonellerdir.

Veterinary Sciences and Practices; Scopus, EBSCO, CABI ve TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin tarafından indekslenmektedir.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE) ve National Information Standards Organization (NISO) kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir. Veterinary Sciences and Practices editöryel ve yayın süreçleri, Akademik Yayıncılıkta Şeffaflık ve En İyi Uygulama (doaj.org/bestpractice) ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Veterinary Sciences and Practices yayınlanma modeli Budapeşte Açık Erişim Girişimi (BOAI) bildirgesine dayanan açık erişimli bilimsel bir dergidir. Derginin arşivine <https://veterinarysciences-ataunipress.org/> adresinden ücretsiz olarak erişilebilir. Veterinary Sciences and Practices'in içeriği, Creative Commons Atıf-GayriTicari (CC-BY-NC) 4.0 Uluslararası Lisansı ile yayınlanmaktadır.

Yazarlara Bilgi'nin güncel versiyonuna <https://veterinarysciences-ataunipress.org/> adresinden ulaşabilirsiniz.

Editor-in-Chief: Mustafa Sinan AKTAŞ

Adres: Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

E-posta: vetdergisi@atauni.edu.tr

Yayıncı: Atatürk Üniversitesi

Adres: Atatürk Üniversitesi, Yakutiye, Erzurum, Türkiye

Yayınevi: AVES

Adres: Büyükdere Cad., 105/9 34394 Şişli, İstanbul, Türkiye

Tel: +90 212 217 17 00

E-posta: info@avesyayincilik.com

Web: www.avesyayincilik.com


CONTENTS / İÇİNDEKİLER

RESEARCH ARTICLES / ARAŞTIRMA MAKALELERİ

- 1 Genetik Parametre Tahmininde Kovaryans Faktörün Kullanılması**
Using Covariance Factor in Genetic Parameter Estimation
Ömer ELTAS, Mehmet TOPAL
- 6 Ratlarda Deltamethrin'in Neden Olduğu Dalak Toksisitesine Karşı Rutin'in Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Oksidatif Stres, Apoptoz ve İnflamasyon Belirteçleri Üzerinden Araştırılması**
Investigating Potential Protective Effects of Rutin against Delatamethrin-Induced Spleen Toxicity in Rats through Oxidative Stress, Apoptosis and Inflammation Markers
Cihan GÜR, Aydın GENÇ, Özge KANDEMİR
- 11 Evaluation of Interleukin and Vitamin Levels in Sheep Infested with *Sarcoptes Scabiei***
Sarcoptes Scabiei ile Enfeste Koyunlarda İnterlökin ve Vitamin Düzeylerinin Değerlendirilmesi
Pelin Fatoş POLAT DİNÇER, Ömer Faruk GÖKCECİK, Alper BAŞA
- 16 Türkiye'de Varroa Akarlarında Lake Sinai Virus (LSV)' un İlk Tespiti**
First detection of Lake Sinai Virus (LSV) in Varroa mites in Turkey
Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN, Murat KAPLAN, Kemal PEKMEZ, Fatih ARSLAN
- 20 Determination of the Content of Bone Inclusions in Multicomponent Meat Products**
Çok Bileşenli Et Ürünlerinde Kemik Kalıntı İçeriğinin Belirlenmesi
Nina USATENKO, Sergii VERBYTSKYI
- 26 Effect of Bromelain Against Nickel Genotoxication in Rats**
Sıçanlarda Nikel Genotoksikasyonuna Karşı Bromelainin Etkisi
Füsün TEMAMOĞULLARI, Pınar AKSU KILIÇLE, Şükrü GÜRLER, Zozan GARİP
- 31 Prevalence of Canine Cardiac Dirofilariosis in Nineveh Governorate of Iraq**
Irak'ın Nineveh Vilayetinde Köpek Kardiyak Dirofilariosis Prevalansı
Maab Ibrahim AL-FARWACHI, Haneen Badran ALMELACHI

Genetik Parametre Tahmininde Kovaryans Faktörün Kullanılması

Using Covariance Factor in Genetic Parameter Estimation

Ömer ELTAS¹ 
Mehmet TOPAL² 

¹Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

²Amasya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Amasya, Türkiye

öz

Bu çalışmada, genetik parametre tahmininde sıkça kullanılan yöntemlerden REML, MINQUE ve MIVQUE yöntemlerinin, modele kovaryans faktör dahil edildiği durumda varyans unsurları tahminindeki etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada simülasyon ile elde edilen, dengeli ve normal dağılımlı veriler kullanılmıştır. Varyans unsurları tahmininde hem sabit hem de şansa bağlı faktörlerin bulunduğu karışık model kullanılmıştır. Süt verimi için kuruda kalma süresi, doğum ağırlığı için ananın canlı ağırlığı kovaryeteler olarak belirlenmiştir. Yöntemlerle elde edilen varyans unsurlarının karşılaştırılmasında, çevre varyansının küçük olması ve çevre varyansının toplam varyansa oranının küçük olması kriterleri esas alınmıştır. Yöntemler karşılaştırıldığında, kovaryetenin modele dahil edildiği durumda hem süt verimi için hem de doğum ağırlığı için en iyi sonuçlar MINQUE yöntemi ile elde edilmiştir. Fakat MINQUE yöntemi ile negatif varyans unsuru elde edilmiştir. MIVQUE yönteminde kovaryetenin modele dahil edilmesi sonucunda çevre varyansının artması, bu yöntemin olumsuz tarafı olarak tespit edilmiştir. Karışık modele kovaryans faktörlerin dahil edildiği ve edilmediği durumlarda, dengeli ve normal dağılımlı verilerde genetik parametre tahminlenirken REML yönteminin sonuçlarının MINQUE ve MIVQUE yöntemlerine göre daha iyi ve güvenilir sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kovaryans faktör, genetik parametre tahmini, karışık model, varyans unsurları tahmin yöntemleri

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the efficiency of REML, MINQUE and MIVQUE methods, which are frequently used methods in estimating genetic parameters, in the estimation of variance components when the covariance factor is included in the model. Balanced and normally distributed data obtained by simulation were used in the study. A mixed model with both fixed and chance factors was used in the estimation of variance components. Dry period for milk yield and dam's live weight for birth weight were determined as covariates. In comparing the variance components obtained by the methods, the criteria of having a small environmental variance and a small ratio of environmental variance to total variance were taken as basis. When the methods were compared, the best results for both milk yield and birth weight were obtained with the MINQUE method when the covariate was included in the model. However, the negative variance was obtained with the MINQUE method. In the MIVQUE method, the increase in environmental variance as a result of the inclusion of the covariate in the model was determined as the negative side of this method. In cases where covariance factors were included or not included in the mixed model, the results of the REML method were found to be better and more reliable than the MINQUE and MIVQUE methods when estimating the genetic parameter in the balanced and normally distributed data.

Keywords: Covariance factor, genetic parameter estimation, mixed model, variance components estimation methods

*Bu makale Ömer ELTAS'ın doktora tez çalışmasından üretilmiştir.

Geliş Tarihi/Received: 26.10.2021

Kabul Tarihi/Accepted: 23.12.2021

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:
Ömer ELTAS
E-posta: omer.eltas@atauni.edu.tr

Atif: Eltas Ö, Topal M. Genetik Parametre Tahmininde Kovaryans Faktörün Kullanılması. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 1-5.

Cite this article: Eltas Ö, Topal M. Using covariance factor in genetic parameter estimation. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 1-5.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

GİRİŞ

Günümüzdeki artan popülasyonun gıda ihtiyacını karşılamak için tarım alanlarının artırılması çevre üzerinde baskı oluşturmaktadır. Bu nedenle tarımda birim başına verimliliğinin artırılması her geçen gün daha fazla önem arz etmektedir. Birçok araştırma yapılarak hayvanların özelliklerinin geliştirilmesi, verimlerinin artırılması ve bu sayede hayvanlardan daha fazla faydalanılması amaçlanmıştır. Hayvan verimlerinin gelecek jenerasyonda artırılması için yapılan bu çalışmalar ıslah çalışmaları olarak değerlendirilir.¹

Hayvanların genetik özelliklerinin ıslahında iki temel yöntem vardır. Bunlardan biri seleksiyon diğeri de melezlemedir. Melezleme yönteminde

farklı ırklar birleştirilerek veriminin artırılması amaçlanır. Seleksiyonda ise yüksek verimli fertlerden yüksek verimli yavruların elde edilmesi amaçlanır.

Hayvanların genetik yapılarındaki farklılıklara dayanarak seleksiyon, genetik olarak ilerlemeyi amaçlamaktadır.¹ Fakat ekonomik olarak önemli olan karakterlerin verimi, ana ve babadan gelen genlerle birlikte çevreye de bağlıdır.² Çevreden kaynaklanan varyasyon bir hata kaynağı olup, genetik araştırmaları ve seleksiyonun doğruluk derecesini etkiler.³ Yani, hayvanın genotipi ne kadar iyi olsa da, çevre şartları iyileştirilmeden verim kapasitesine ulaşamaz. Yine çevre şartları da ne kadar iyi olursa olsun, hayvanın genetik yapısının sınırladığı verim seviyesini aşmak da mümkün değildir.

Hayvan ıslahında kullanılan genetik özelliklere ait istatistikler genetik parametreler olarak adlandırılmaktadır. Kullanılan bu genetik parametreler kalıtım derecesi, tekrarlanma derecesi, genetik korelasyon ve grup içi korelasyondur.

Varyans unsurları belirlenerek genetik parametreler tahminlenir. Varyansa sebep olan faktörler belirlenerek bunların toplam varyanstaki payları ve hesaplanamayan çevre faktörlerinden ileri gelen hata varyansı tahminlenir. Tahminlenen bu varyanslardan genetik parametreler belirlenir.⁴

Varyans unsurları hesaplanırken 3 farklı model kurulabilir. Bunlar; sadece sabit faktörlerin bulunduğu Sabit model, sadece şansa bağlı faktörlerin bulunduğu Şansa bağlı model ve hem sabit hem de şansa bağlı faktörlerin birlikte bulunduğu Karışık modellerdir.⁵⁻⁹

Varyans unsurlarının tahmininin hayvan ıslahındaki önemi şu şekilde sıralanabilir;

1. Hayvanların gerçek verim kabiliyetlerinin, baba ve bunların kızlarının genetik değerlerinin tahmini,
2. Varyasyon kaynaklarının belirlenmesi,
3. Progeny test programlarının oluşturulması,
4. Genetik X Genetik, Genetik X Çevre, Çevre X Çevre interaksiyonlarının hesaplanması,
5. Seleksiyon indekslerinin oluşturulması,
6. Fenotipik ve çevre korelasyonlarının tahmini,
7. Islah programlarının planlanması,
8. Kantitatif özelliklerde genetik mekanizmanın yorumu.¹⁰⁻¹²

Varyans unsurlarının tahmininde varyans analizi (ANOVA), Minimum Varyans Kuadratik Sapmasız Tahmin (MIVQUE), Minimum Norm Kuadratik Sapmasız Tahmin (MINQUE), En Yüksek Olabilirlik (ML), Kısıtlanmış En Yüksek Olabilirlik (REML), Henderson I, II, III gibi yöntemler bulunmakta olup, karışık modellerde çoğunlukla REML yöntemi kullanılmaktadır.^{13,14}

REML ve ML yöntemi normal dağılım gösteren veriler için kullanılırken, MINQUE yöntemi dağılım varsayımlarına dayanmadan varyans ve kovaryans bileşenlerini tahmin etmek için geliştirilmiştir.¹⁵

REML yöntemi MIVQUE ve ML'dan türetilebilir. REML yöntemi iteratif bir yöntemdir. Sabit etkilerinden kaynaklanan sapma bu yöntem ile yok edilmektedir.¹⁶⁻²⁰

Bu çalışmanın amacı dengeli ve normal dağılım gösteren verilerde karışık model kullanılarak, kovaryans faktörün modele dahil edildiği ve edilmediği durumlarda varyans unsurlarını REML, MIVQUE ve MINQUE yöntemleri ile tahminlemektir. Varyans unsurlarının tahmininde sıkça kullanılan bu yöntemlerde, modele kovaryatenin dahil edilmesinin etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal olarak simülasyon ile elde edilen veriler kullanılmıştır. Örnek büyüklüğü, 25 baba ve 50 anadan elde edilen 250 ineğin her birinin 4 doğum kaydı olmak üzere 1000 olarak belirlenmiştir. Gerçek gözlemlere yakın değerler bulmak için, Cura²¹ tarafından yapılan çalışmada bulunan istatistikler (ortalama ve standart sapma), veri seti oluşturmak için kullanılmıştır. Adı geçen bu çalışmada, Trakya Bölgesi'ndeki Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'ne bağlı işletmelerden alınan, 296 775 baş siyah alaca ırkı sığira ait 677 289 verim kaydı değerlendirilmiştir. Yapılan diğer çalışmalara nazaran bu çalışmadaki örnek büyüklüğünün daha yüksek olması, bu çalışmadan elde edilen istatistiklerin kullanılmasının daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Kovaryans faktörün modele dahil edilebilmesi için bağımlı değişken ile ortak değişkenler arasındaki korelasyon katsayısının 0,3'ten büyük olması gerekmektedir. Bu varsayımı sağlamak için değişkenler arasındaki korelasyon katsayısı (r) '0,5' olarak alınmıştır. Bu istatistiklere göre varyans-kovaryans matrisi hesaplanmış ve bu matrise göre veri seti oluşturulmuştur.

Yöntem

Varyans unsurları

Varyans bileşenlerinin hesaplanmasında hem sabit faktörlerin hem de şansa bağlı faktörlerin bulunduğu karışık model kullanılmış olup laktasyon, doğum ayı ve doğum yılı sabit faktörler iken ana, baba ve bireyin etkisi şansa bağlı faktörler olarak kullanılmıştır. Süt verimi için kuruda kalma süresi (KKS), doğum ağırlığı için ise ananın canlı ağırlığı (Canlı ağırlık) ortak değişken olarak belirlenmiş olup kovaryans faktörün dahil edildiği durumda varyans unsurları bu şekilde hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalarda KKS'nin süt verimine²², ananın canlı ağırlığının da doğum ağırlığına²³ etkilerinin istatistiksel açıdan önemli oldukları belirtilmiştir. Yine yapılan bazı çalışmalarda^{24,25} KKS'nin süt verimini etkileyen makro çevre faktörlerinden biri olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir tez çalışmasında²⁶, ana ağırlığı ile doğum ağırlığı arasında önemli bir korelasyonun olduğu bildirilmiştir.

Süt verimi değişkenine ait varyans değeri çok büyük olduğundan ve hesaplamalarda kolaylık sağlaması için, süt verimi değişkeni 1000'e bölünerek varyans unsurları hesaplanmıştır.

Veri setinde tüm alt gruplarda gözlem sayıları eşit olduğundan dolayı veriler dengelidir. Birey modeliyle varyans unsurları tahminlenmiştir. Modelin matris notasyonu;

$Y = Xb + Zu + e$ şeklinde olup modelde yer alan terimler;

Y: Nxl boyutlu gözlem vektörü,

X: Nxq boyutlu ve rankı q olan sabit etkilere ait desen matrisi,

Z: Nxr boyutunda ve rankı r olan şansa bağlı etkilere ait desen matrisi,

b: qxl boyutunda sabit etkiler vektörü,

u: rxl boyutunda şansa bağlı etkilerin vektörü,

e: hata terimi olup, ortalaması sıfır ve varyans-kovaryans matrisi σ_e^2 'dir.

Varyans unsurları yöntemlerinin kıyaslamasında hata varyansını minimum tahmin eden yöntem, en iyi yöntem olarak açıklanmaktadır.^{12,27} Ancak, varyans bileşenlerinin toplam varyasyondaki oranı, yöntemlerin kıyaslanmasında diğer önemli bir ölçüt olarak alınmakta ve hatanın toplam varyasyondaki oranının küçük olması istenmektedir.²⁸ Her iki yöntemle de karşılaştırmalar yapılmıştır.

Varyans unsurları tahminleri için REML ve MIVQUE yöntemleri SAS 9.4 paket programında MIXED prosedürü kullanılmıştır. SAS paket programında bulunmayan, varyans unsurları tahmin metodlarından olan MINQUE yöntemi için SPSS versiyon 18 (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, IL, ABD) paket programında GLM prosedürü kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışma için simülasyon ile elde edilen süt verimi, doğum ağırlığı, ananın canlı ağırlığı ve kuruda kalma süreleri değişkenlerine ait ortalama ve standart hataları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'de simülasyon ile elde edilen süt verimi değişkeninin ortalaması 5650,04 litre standart hatası 43,34, doğum ağırlığının ortalaması 39,99 kg standart hatası 0,19, ananın canlı ağırlığı

Tablo 1. Bağımlı değişkenler ve kovaryetelere ait tanımlayıcı istatistikler

	N	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
Süt Verimi	1000	5650,043 \pm 43,335
Doğum Ağırlığı	1000	39,986 \pm 0,186
Canlı Ağırlık	1000	500,588 \pm 3,467
KKS	1000	56,161 \pm 0,408

KKS, Kuruda Kalma Süresi

Tablo 2. REML yöntemine göre süt verimi için varyans unsurları tahminleri

Kaynaklar	Kovaryans Faktör Yok	Kovaryans Faktör Var
σ_g^2	0,6500	0,6879
σ_e^2	0,7123	0,7104
σ_p^2	1,3623	1,3983
h^2	0,4800 \pm 0,033	0,4900 \pm 0,033

 σ_g^2 , Genotipik Varyans; σ_e^2 , Çevre Varyansı; σ_p^2 , Fenotipik Varyans; h^2 , Kalıtım Derecesi**Tablo 3. MINQUE yöntemine göre süt verimi için varyans unsurları tahminleri**

Kaynaklar	Kovaryans Faktör Yok	Kovaryans Faktör Var
σ_g^2	0,6520	1,2870
σ_e^2	0,7120	0,6760
σ_p^2	1,3580	1,9630
h^2	0,4801 \pm 0,033	0,6556 \pm 0,026

 σ_g^2 , Genotipik Varyans; σ_e^2 , Çevre Varyansı; σ_p^2 , Fenotipik Varyans; h^2 , Kalıtım Derecesi**Tablo 4. MIVQUE yöntemine göre süt verimi için varyans unsurları tahminleri**

Kaynaklar	Kovaryans Faktör Yok	Kovaryans Faktör Var
σ_g^2	0,6507	0,6626
σ_e^2	0,7163	0,7218
σ_p^2	1,3670	1,3844
h^2	0,4760 \pm 0,033	0,4786 \pm 0,033

 σ_g^2 , Genotipik Varyans; σ_e^2 , Çevre Varyansı; σ_p^2 , Fenotipik Varyans; h^2 , Kalıtım Derecesi**Tablo 5. REML yöntemine göre doğum ağırlığı için varyans unsurları tahminleri**

Kaynaklar	Kovaryans Faktör Yok	Kovaryans Faktör Var
σ_g^2	1,2358	0,5945
σ_e^2	25,0561	22,8315
σ_p^2	26,2919	23,4260
h^2	0,0470 \pm 0,028	0,0250 \pm 0,027

 σ_g^2 , Genotipik Varyans; σ_e^2 , Çevre Varyansı; σ_p^2 , Fenotipik Varyans; h^2 , Kalıtım Derecesi**Tablo 6. MINQUE yöntemine göre doğum ağırlığı için varyans unsurları tahminleri**

Kaynaklar	Kovaryans Faktör Yok	Kovaryans Faktör Var
σ_g^2	1,4050	2,7430
σ_e^2	25,0700	22,7430
σ_p^2	26,4750	25,4860
h^2	0,0531 \pm 0,028	0,1076 \pm 0,031

 σ_g^2 , Genotipik Varyans; σ_e^2 , Çevre Varyansı; σ_p^2 , Fenotipik Varyans; h^2 , Kalıtım Derecesi**Tablo 7. MIVQUE yöntemine göre doğum ağırlığı için varyans unsurları tahminleri**

Kaynaklar	Kovaryans Faktör Yok	Kovaryans Faktör Var
σ_g^2	1,3479	0,5709
σ_e^2	25,0635	23,0410
σ_p^2	26,4114	23,6119
h^2	0,0510 \pm 0,028	0,0242 \pm 0,027

 σ_g^2 , Genotipik Varyans; σ_e^2 , Çevre Varyansı; σ_p^2 , Fenotipik Varyans; h^2 , Kalıtım Derecesi

ortalaması 500,59 kg standart hatası 3,47 ve kuruda kalma süresinin ortalaması 56,16 gün standart hatası 0,41 olarak tespit edilmiştir.

Süt verimine ait varyans unsurları tahminleri hem kovaryans faktör olduğu durumda hem de kovaryans faktör olmadığı durumda tahminlenmiştir. Varyans unsurları tahminleri için REML, MINQUE, MIVQUE metotları kullanılmıştır. Süt verimi için kuruda kalma süresi değişkeninin modele kovaryete olarak dahil edildiği ve edilmediği durumlarda REML yöntemi kullanılarak elde edilen varyans unsurları sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Süt verimi için REML yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçlarına göre kovaryans faktörün modele dahil edilmesi ile genotipik varyans artmış ve çevre varyansı azalmıştır. Genotipik varyanstaki artış miktarı çevre varyansındaki azalma miktarından fazla olduğu için fenotipik varyans değeri de artmıştır. Kovaryetenin modele dahil edilmesi durumunda genotipik varyansın artması ve çevre varyansının azalması sonucunda kalıtım derecesi de artmıştır (Tablo 2).

Süt verimi için kuruda kalma süresi değişkeninin kovaryete olarak modele dahil edildiği ve edilmediği durumlarda MINQUE yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucunda elde edilen varyans unsurları Tablo 3'te verilmiştir.

Süt verimi için MINQUE yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçlarına göre kovaryans faktörün modele dahil edilmesi ile genotipik varyans artmış ve çevre varyansı azalmıştır. Genotipik varyanstaki artış miktarı çevre varyansındaki azalma miktarından fazla olduğu için fenotipik varyans değeri de artmıştır. Genotipik varyanstaki artış ve çevre varyansındaki azalma sonucunda kalıtım derecesi de artmıştır (Tablo 3).

MIVQUE yöntemi kullanılarak, süt verimi için kuruda kalma süresi değişkeninin kovaryete olarak modele dahil edildiği ve edilmediği durumlarda yapılan analizler sonucunda elde edilen varyans unsurları Tablo 4'te verilmiştir.

Süt verimi için MIVQUE yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçlarına göre kovaryans faktörün modele dahil edilmesi genotipik varyans ve çevre varyansını arttırmıştır. Bu artışlardan dolayı fenotipik varyans değeri de artmıştır. Genotipik varyanstaki artış oranı, çevre varyansındaki artış oranına kıyasla daha fazla olduğu için kalıtım derecesi de artmıştır (Tablo 4).

Doğum ağırlığı üzerine varyans unsurları tahminlemede, kovaryans faktör olarak ananın canlı ağırlığı modele dahil edilmiştir. Doğum ağırlığı için canlı ağırlık değişkeninin kovaryete olarak modele dahil edildiği ve edilmediği durumlarda REML yöntemi kullanılarak elde edilen varyans unsurları sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

Süt verimi için REML yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçlarına göre kovaryans faktörün modele dahil edilmesi ile genotipik varyans ve çevre varyansı azalmıştır. Çevre varyansındaki azalma miktarı genotipik varyanstaki azalma miktarından fazla olduğu için fenotipik varyans değeri de azalmıştır. Kovaryetenin modele dahil edilmesi durumunda çevre varyansındaki azalma oranının ve genotipik varyanstaki azalma oranına kıyasla daha fazla olması sebebiyle kalıtım derecesi de azalmıştır (Tablo 5).

Doğum ağırlığı için canlı ağırlık değişkeninin kovaryete olarak modele dahil edildiği ve edilmediği durumlarda MINQUE yöntemi kullanılarak elde edilen varyans unsurları sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

Doğum ağırlığı için MINQUE yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçlarına göre kovaryans faktörün modele dahil edilmesi ile genotipik varyans artmış ve çevre varyansı azalmıştır. Çevre varyansındaki azalma ve genotipik varyansın artması sebebiyle

kalıtım derecesi artmıştır. Çevre varyansındaki azalma miktarı genotipik varyanstaki artış miktarından fazla olduğu için fenotipik varyans azalmıştır (Tablo 6).

Doğum ağırlığı için canlı ağırlık değişkeninin modele kovaryete olarak dahil edildiği ve edilmediği durumlarda MIVQUE yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçları Tablo 7'de verilmiştir.

Doğum ağırlığı için MIVQUE yöntemi ile elde edilen varyans unsurları sonuçlarına göre kovaryans faktörün modele dahil edilmesi ile genotipik varyans ve çevre varyansı azalmıştır. Bu azalmalardan dolayı fenotipik varyans da azalmıştır. Genotipik varyanstaki azalma oranı çevre varyansına kıyasla daha fazla olduğu için kalıtım derecesi de azalmıştır (Tablo 7).

TARTIşMA

Süt verimi için elde edilen varyans unsurları sonuçlarında kovaryans faktörün modele dahil edilmediği durumda, REML ve MINQUE yöntemlerinde hem çevre varyansının küçük olması hem de çevre varyansının toplam varyansa oranının küçük olması kriterleri bakımından benzer sonuçlar elde edilmiş ve bu sonuçların MIVQUE yöntemi ile elde edilen sonuçlardan daha iyi olduğu tespit edilmiştir. KKS değişkeninin kovaryete olarak modele dahil edilmesiyle REML ve MINQUE yöntemlerinde çevre varyansı azalırken MIVQUE yönteminde çevre varyansı artmıştır. Kovaryetenin modele dahil edilmesinin amacı, kontrol edilemeyen çevre varyansının bir kısmının kovaryete aracılığıyla kontrol altına alınarak çevre varyansının azaltılmasıdır. Bu sebeple MIVQUE yönteminde kovaryetenin modele dahil edilmesi sonucunda çevre varyansının artması olumsuz bir sonuç olarak belirlenmiştir. Kovaryetenin modele dahil edildiği durumda elde edilen varyans unsurlarında her iki karşılaştırma kriterine göre MINQUE yöntemi ile REML yöntemine göre daha iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen negatif varyans elde edilmiş olması, MINQUE yönteminin olumsuz bir sonucu olarak tespit edilmiştir.

Doğum ağırlığı için kovaryetenin modele dahil edilmediği durumda elde edilen varyans unsurlarında, çevre varyansının küçük olması kriteri bakımından en iyi sonuç REML yöntemi ile elde edilmişken, çevre varyansının toplam varyansa oranının küçük olması kriterine göre en iyi sonuç MINQUE yöntemi ile saptanmıştır. Canlı ağırlık değişkeni kovaryete olarak modele dahil edildiği durumda elde edilen varyans unsurlarında her iki karşılaştırma kriteri bakımından en iyi sonuçlar MINQUE yöntemi ile elde edilirken en kötü sonuçlar MIVQUE yöntemi ile belirlenmiştir.

Yöntemlerle elde edilen sonuçlardaki farklılıkların sebebi, yöntemlerin farklı metotlarla varyans unsurlarını tahmin etmesi ve farklı varsayımlar gerektirmeleridir. En Yüksek Olabilirlik (EYO) metodu sabit faktörlerin serbestlik derecesini dikkate almamakta ve normal dağılım gösteren verilerde daha tutarlı sonuçlar vermektedir. EYO metodunun normal olmayan dağılımlardaki sapması MIVQUE yöntemi ile giderilmiştir. Bu sebeple MIVQUE yöntemi normallik varsayımını gerektirmemekte ve parametre kestiriminde EYO metodunu kullanmaktadır. REML yöntemi de parametre kestirimi için MIVQUE yöntemi gibi EYO metodunu kullanmaktadır. EYO yönteminde parametrelere ait başlangıç değerleri girilmekte ve iterasyon yöntemi ile olabilirliğin maksimum olduğu noktadaki parametre kombinasyonu belirlenmektedir. Ayrıca dengesiz verilerde doğrusal modellerin kullanımına yönelik olarak geliştirilen EYO yöntemi, verilerdeki olası bütün genetik ilişkileri dikkate alabilmekte ve verilerin dengeli olmasını gerektirmemektedir. MINQUE yöntemi parametre kestiriminde En Küçük Kareler (EKK) metodunu kullanmaktadır. EKK metodunda istatistikler regres-

yon analizi veya varyans analizi kullanılarak elde edilir ve verilerin dengeli olması ile birlikte ebeveynlerin popülasyondan rasgele seçilmiş olmaları varsayımlarını gerektirir. Bu çalışmada, EKK yönteminin gereksinimi olan verilerin dengeli olması varsayımının karşılanmış olması sebebiyle MINQUE yöntemi ile daha olumlu sonuçlar elde edilmiş olabilir. EKK metodunda varyans unsurlarının negatif çıkmaması için bazı yöntemler bulunmaktadır. Fakat MINQUE yönteminde hesaplama tekniğinden dolayı bu durum engellenememekte ve negatif varyans elde edilebilmektedir. Doğum ağırlığında negatif varyans görülmemesine rağmen, süt verimi için de aynı model kullanılmış ve negatif varyans elde edilmiştir. Elde edilen negatif varyansın oluşturulan modelden veya veri setinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu sebeple çalışmadan elde edilen MINQUE sonuçlarının güvenilir olmadığına kanaat getirilmiştir.

Mevcut çalışmayla benzer olarak yürütölen bazı çalışmalarda-REML yönteminin MIVQUE yöntemine göre²⁹, REML yönteminin MINQUE yöntemine göre³⁰⁻³², verilerin normal dağılıma sahip olduğu karmaşık modellerde REML yönteminin MINQUE yöntemine göre³³ varyans unsurları bakımından daha iyi tahminler yaptığını, MIVQUE yöntemlerinin daha sapmasız ve kararlı tahminler vermesine karşılık, negatif tahmin verme eğiliminin yüksek olması nedeniyle tercih edilmesinin kısıtlı olduğu, sapmalı olmakla birlikte parametre alanında tahminleme yapan REML yönteminin karışık modellerde tercih edilebileceğini bildirmişlerdir.³⁴ Yapılan bazı çalışmalarda mevcut çalışmadan elde edilen sonuçların aksine, iki yönlü karışık modelde REML ve MINQUE yöntemlerinin baba varyansı ve kalıtım derecesi için benzer değerler verdiđini³⁵, dengeli veriler için REML ve MINQUE yöntemlerinde varyans bileşenlerinin birbirine eşit olarak bulunduđunu³⁶, testin gücü ve Tip-I hata bakımından REML ve MINQUE yöntemlerinin eşit olduğunu fakat hesaplama süresi bakımından MINQUE yönteminin zamandan daha fazla tasarruf ettiği sonucuna ulaşıldığını bildirmişlerdir.³⁷

Doğum ağırlığında ananın canlı ağırlığının kovaryans faktör olarak modele dahil edilmesi ile tüm yöntemlerde çevre varyansı düşmesine karşın, süt verimi için kuruda kalma süresi kovaryans faktör olarak modele dahil edildiğinde MIVQUE yönteminde çevre varyansları artmıştır. Bu sebeple MIVQUE yönteminde kovaryetenin olumsuz yönde etki yaptığı tespit edilmiştir. Çünkü çevre varyansı düşük olan denemelerin, belirleme (determinasyon) katsayısı daha büyük olduğu için sonuçları da daha güvenilirlerdir.

Kovaryans faktörün modele dahil edilmediği durumda, bağımlı değişkenlerin varyansına en yakın değer REML yöntemi ile elde edilmiştir. Kovaryans faktörlerin modele dahil edildiği durumda bağımlı değişkenin varyansına en yakın değerler, süt verimi için REML yöntemi ile elde edilirken doğum ağırlığı için MINQUE metodu ile elde edilmiştir. MINQUE yöntemi ile doğum ağırlığı için en yüksek kalıtım derecesi hesaplanmış fakat bu yöntemle negatif varyans elde edildiği için, bu çalışmada kullanılan modelde ve veri setinde MINQUE yöntemi ile elde edilen sonuçların güvenilir olmayacağı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan dengeli ve normal dağımlı karışık modellerde, kovaryans faktörün modele dahil edildiği ve edilmediği durumlarda en iyi ve en güvenilir sonuçlar REML yöntemi ile elde edilmiştir. Bu çalışmada kovaryans faktörün kullanımının sebebi kontrol edilemeyen çevre varyansının bir kısmının, kovaryeteler kullanılarak kontrol altına alınmasıdır. Bu sayede çevre varyansından, kovaryetelerin neden olduğu varyans çıkarılarak çevre varyansı azaltılmaktadır. Çevre varyansının azalması da belirleme katsayısının artmasını ve tahminlenen varyans unsurlarının daha güvenilir olmasını sağlayacaktır.

Etik Komite Onayı: N/A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – M.T.; Tasarım – Ö.E., M.T.; Denetleme – M.T.; Kaynaklar – Ö.E.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – Ö.E.; Analiz ve/veya Yorum – Ö.E.; Literatür Taraması – Ö.E.; Yazıyı Yazan – Ö.E.; Eleştirel İnceleme – M.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – M.T.; Design – Ö.E., M.T.; Supervision – M.T.; Resources – Ö.E.; Data Collection and/or Processing – Ö.E.; Analysis and/or Interpretation – Ö.E.; Literature Search – Ö.E.; Writing Manuscript – Ö.E.; Critical Review – M.T.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Chauhan A, Dahiya SP, Bangar YC, Magotra A. The estimation of (co) variance components and genetic parameters for growth and wool traits in Harnali sheep. *Small Ruminant Res.* 2021;203:106485. [\[Crossref\]](#)
2. Erkmen R, Kul E. Genetic relationships between type traits with milk yield and reproductive traits in Holstein Cows. *Anadolu J Agr Sci.* 2021;36(3), 454-463. [\[Crossref\]](#)
3. Falconer DS. *Introduction to quantitative Genetics.* 3rd ed., Longman Scientific & Technical, Harlow. 1989.p.430.
4. Karadağ Ö. A multivariate heterogeneous variance components model for multi-environment studies with locational genetic effects. *Soft Computing.* 2021;1-6. [\[Crossref\]](#)
5. Kline P, Saggio R, Sølvsten M. Leave-out estimation of variance components. *Econometrica.* 2020;88(5):1859-1898. [\[Crossref\]](#)
6. Veerman JR, Leday GG, van de Wiel MA. Estimation of variance components, heritability and the ridge penalty in high-dimensional generalized linear models. *Commun Stat-Sim Com.* 2019;1-19. [\[Crossref\]](#)
7. Baey C, Kuhn E. varTestnlme: an R package for Variance Components Testing in Linear and Nonlinear Mixed-effects Models. arXiv preprint arXiv: 2020;2007.04791.
8. Schielzeth H, Dingemanse NJ, Nakagawa S, Westneat DF, Allogue H, Teplitsky C, Araya-Ajoy YG. Robustness of linear mixed-effects models to violations of distributional assumptions. *Methods Ecology Evolution.* 2020;11(9):1141-1152. [\[Crossref\]](#)
9. Choi J. Nonnegative variance component estimation for mixed-effects models. *Commun Stat App Methods.* 2020;27(5):523-533. [\[Crossref\]](#)
10. VanVleck LD, Wadell LH, Henderson CR. Components of variance associated with milk and fat records of artificially sired Holstein daughters. *J Animal Sci.* 1961;20(4):812-816. [\[Crossref\]](#)
11. Cunningham EP, Henderson CR. An iterative procedure for estimating fixed effects and variance components in mixed model situations. *Biometrics.* 1968;24(1):13-25. [\[Crossref\]](#)
12. Kayaalp GT, Bek Y. Varyans unsurları tahmin yöntemlerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi. *Çukurova Üniv Ziraat Fak Dergisi.* 1994;9(2):127-142.
13. Žežula I, Klein D. On drawbacks of least squares Lehmann-Scheffé estimation of variance components. *Metron.* 2021;79(1):109-119. [\[Crossref\]](#)
14. Zhou H, Hu L, Zhou J, Lange K. MM algorithms for variance components models. *J Comput Graph Stat.* 2019;28(2):350-361. [\[Crossref\]](#)
15. Wu CT, Gumpertz ML, Boos DD. Comparison of GEE, MINQUE, ML, and REML estimating equations for normally distributed data. *Am Stat.* 2001;55(2):125-130. [\[Crossref\]](#)
16. Kennedy BW. C. R. Henderson: The unfinished legacy. *J Dairy Sci.* 1991;74(11):4067-4081. [\[Crossref\]](#)
17. Sallam AM, Ibrahim AH, Alsheikh SM. Estimation of genetic parameters and variance components of pre-weaning growth traits in Barki lambs. *Small Rumin Res.* 2019;173:94-100. [\[Crossref\]](#)
18. Baek E, Beretvas SN, Van den Noortgate W, Ferron JM. Brief research report: Bayesian versus REML estimations with noninformative priors in multilevel single-case data. *J Exp Educ.* 2020;88(4):698-710. [\[Crossref\]](#)
19. Baek E, Ferron JJ. Modeling heterogeneity of the level-1 error covariance matrix in multilevel models for single-case data. *Methodology.* 2020;16(2):166-185. [\[Crossref\]](#)
20. Li H, Luo W, Baek E, Thompson CG, Lam KH. Estimation and statistical inferences of variance components in the analysis of single-case experimental design using multilevel modeling. *Behav Res Method.* 2021;1-21. [\[Crossref\]](#)
21. Cura ÖE. *Trakya Bölgesinde Siyah-Alaca süt sığırlarda döl ve süt verimlerinin bazı sistemik faktörler açısından değerlendirilmesi.* Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 2016.
22. Atıl H. Ratio and regression factors for predicting 305 day production from part lactation milk records in a herd of Holstein Friesian Cattle. *Pakistan J Biological Sci.* 1999;2(1):31-37. [\[Crossref\]](#)
23. Kahraman ZY, Eliçin ATD. *Akkeçi oğlaklarında doğum ve süten kesim ağırlığına etki eden bazı çevre faktörleri üzerine araştırmalar.* Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 1991.
24. Duru S, Tuncel E. Koçuş Tarım İşletmesinde yetiştirilen Siyah Alaca sürüsünde süt ve döl verim özellikleri. *Türk J Vet Anim Sci.* 2002;26:97-101.
25. Gök B. *Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen esmer sığırların laktasyon devamlılık indeksine bazı çevre faktörlerinin etkisi.* Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 2010.
26. Pekiyi A. *Köy koşullarındaki Tahirova X kıvrıkcık melezi koyunlarında çeşitli verimlerle ilgili genetik parametreler.* Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 1988.
27. Karabayır A. *Atatürk Üniversitesi tarım işletmesinde yetiştirilen esmer sığırların süt verim özellikleri için farklı metod ve modeller ile varyans unsurları ve kalıtım derecesi tahminleri.* Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 1996.
28. Esenbuğa N, Dayıoğlu H. Biyometrik özelliklerde minimum hata varyansı. *Dumlupınar Üni Fen Bil Enst Derg.* 2001;(002):31-43.
29. Liu Y, Luo F, Zhang D, Liu H. Comparison and robustness of the REML, ML, MIVQUE estimators for multi-level random mediation model. *J Appl Stat.* 2017;44(9):1644-1661. [\[Crossref\]](#)
30. Westfall PH. A Comparison of variance component estimates for arbitrary underlying distributions. *J Am Stat Assoc.* 1987;82(399):866-874. [\[Crossref\]](#)
31. Searle SR. An overview of variance component estimation. *Metrika.* 1995;42:215-230. [\[Crossref\]](#)
32. Lele S, Taper ML. A composite likelihood approach to (co)variance components estimation. *J Stat Plan Inference.* 2002;103(1-2):117-135. [\[Crossref\]](#)
33. El Leithy HA, Abdel Wahed ZA, Abdallah MS. On non-negative estimation of variance components in mixed linear models. *J Adv Res.* 2016;7(1):59-68. [\[Crossref\]](#)
34. Orhan H. *Varyans unsurları tahmin yöntemlerinin Monte Carlo çalışması ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi.* Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 1997.
35. Lin CY, McAllister AJ. Monte Carlo comparison of four methods for estimation of genetic parameters in the univariate case. *J Dairy Sci.* 1984;67(10):2389-2398. [\[Crossref\]](#)
36. Doğan İ, Kılıç İ. A comparative study on variance components estimation methods. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg.* 2014;1(2):9-14.
37. Nan N, Jenkins JN, McCarty JC, Wu J. Comparison of REML and MINQUE for estimated variance components and predicted random effects. *Open J Stat.* 2016;6(5):814-823. [\[Crossref\]](#)

Ratlarda Deltametrin'in Neden Olduğu Dalak Toksisitesine Karşı Rutin'in Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Oksidatif Stres, Apoptoz ve İnflamasyon Belirteçleri Üzerinden Araştırılması

Investigating Potential Protective Effects of Rutin against Deltametrin-Induced Spleen Toxicity in Rats through Oxidative Stress, Apoptosis and Inflammation Markers

Cihan GÜR 
Aydın GENÇ 
Özge KANDEMİR 

Atatürk Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,
Erzurum, Türkiye



Geliş Tarihi/Received: 19.08.2021
Kabul Tarihi/Accepted: 14.02.2022

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:
Cihan GÜR
E-posta: cihan.gur@atauni.edu.tr

Atif: Gür C, Genç A, Kandemir Ö. Ratlarda Deltametrin'in Neden Olduğu Dalak Toksisitesine Karşı Rutin'in Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Oksidatif Stres, Apoptoz ve İnflamasyon Belirteçleri Üzerinden Araştırılması. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 6-10.

Cite this article: Gür C, Genç A, Kandemir Ö. Investigating potential protective effects of rutin against delatamethrin-induced spleen toxicity in rats through oxidative stress, apoptosis and inflammation markers. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 6-10.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

ÖZ

Çalışmada deltametrinin (DLM) meydana getirdiği dalak toksisitesine karşı rutin'in (RUT) koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada Sprague dawley ratlara 28 gün boyunca DLM ve/veya RUT uygulandı. DLM'nin dalak dokusunda malondialdehit (MDA) seviyelerini arttırdığı, glutatyon (GSH) seviyelerini ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin mRNA transkript seviyelerini ise azalttığı belirlendi. RUT tedavisinin ise MDA seviyelerinde azalma meydana getirdiği, SOD, KAT ve GPx ekspresyonlarını aktive ettiği ve GSH seviyelerini arttırdığı görüldü. Ayrıca RUT'un DLM tarafından aktive edilen mitojenle aktive edilen protein kinaz 14 (MAPK14), nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve interlökin 1 beta (IL-1β) ekspresyonlarını baskılayarak dalak dokusunda anti-enflamatuar etki gösterdiği belirlendi. DLM tarafından baskılanan anti-apoptotik protein B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ekspresyonunun RUT tarafından aktive edildiği görüldü. Ayrıca apoptotik protein olan Bcl-2 ile ilişkili X proteininin (Bax) DLM tarafından aktive edildiği, RUT tarafından ise baskılandığı elde edilen diğer bulgulardandır. Sonuç olarak DLM'nin oksidatif strese, enflamasyona ve apoptoza neden olarak dalak dokusunda toksik etki gösterdiği bununla birlikte RUT'un antioksidan, anti-enflamatuar ve anti-apoptotik etki göstererek dalak dokusunu DLM'nin toksik etkisinden koruduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, deltametrin, inflamasyon, oksidatif stres, rutin

ABSTRACT

In this study, the protective effects of rutin (RUT) against spleen toxicity caused by deltamethrin (DLM) were investigated. For this purpose, DLM and/or RUT were applied to Sprague dawley rats for 28 days. According to results, DLM increased malondialdehyde (MDA) levels in spleen tissue, decreased glutathione (GSH) levels and mRNA transcript levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes. RUT treatment caused a decrease in MDA levels, activated SOD, KAT and GPx expressions and increased GSH levels. Also, RUT showed anti-inflammatory effect in spleen tissue by suppressing the expressions of mitogen-activated protein kinase-14 (MAPK14), nuclear factor kappa-B (NF-κB) and interleukin-1-beta (IL-1β) activated by DLM. It was observed that the expression of anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) suppressed by DLM was activated by RUT. It is also among the other findings that the apoptotic protein Bcl-2-related X protein (Bax) is activated by DLM and suppressed by RUT. As a result, it was determined that DLM had a toxic effect on spleen tissue by causing oxidative stress, inflammation and apoptosis, however, RUT demonstrated antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects and protected spleen tissue from the toxic effect of DLM.

Keywords: Apoptosis, deltamethrin, inflammation, oxidative stress, rutin

GİRİŞ

Giderek artan çevre kirliliği insan sağlığına ciddi zararlar vermektedir.¹ Çevre kirliliğine neden olan ve insanlar dahil birçok canlıyı olumsuz etkileyen faktörlerden biri de pestisitlerdir.² Pestisitler arasında deltametrin (DLM), tarımsal ürünleri, sebzeleri ve meyveleri karınca, akar, böcek ve bit gibi zararlılara karşı korumak için yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu sentetik bir dibro-

mo-piretroid insektisitir.³ DLM başlangıçta memeli türleri için pestisitler arasında en az toksik bileşik olarak kabul edildi ancak yapılan çalışmalar DLM'nin memeli ve memeli olmayan organizmalarda çeşitli toksik etkilere neden olduğunu göstermiştir.⁴ DLM'nin muhtemelen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumunu tetikleyerek oksidatif strese neden olduğu ve toksisitesini bu şekilde gösterdiği bildirilmiştir.⁴ Bu nedenle DLM toksisitesine karşı

doğal olarak meydana gelen antioksidanların kullanımı yoğun ilgi görmektedir.⁵⁻⁷

Flavonoidler çeşitli meyve, sebze ve bitkisel ürünlerden doğal olarak elde edilen fenolik bileşiklerdir ve birçok çalışmada antioksidan, anti-enflamatuar ve antiapoptotik özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir.⁸⁻¹³ Bu nedenle son zamanlarda araştırmacıların ilgi odağı haline gelmişlerdir. Rutin (RUT) (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-rhamnoglukozit) flavonol kersetin ve disakarit rutinozdan oluşan bir flavondur.¹³⁻¹⁵ RUT'un önceki çalışmalarda antioksidan, antibakteriyel, anti-kanserojen, anti-enflamatuar, vazodilatör, immünomodülatör ve hepatoprotektif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir.^{14,16-20}

Sunulan çalışmada DLM'nin neden olduğu dalak toksisitesine karşı RUT'un potansiyel koruyucu etkileri oksidatif stres, enflamasyon ve apoptozda rol oynayan bazı biyolojik belirteçler üzerinden araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kimyasallar

Rutin, deltametrin ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)'dan temin edildi.

Hayvanlar ve Etik Kurul Onayı

Deneyde Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen yaşları 10-12 hafta ve ağırlıkları 220-250 gr olan 35 adet erkek Sprague Dawley ratlar kullanıldı. Çalışmanın etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi'nin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (Tarih: 29 Mayıs 2020, Protokol Numarası: 2020-05-78). Hayvanların beslenmelerinde çeşme suyu ve standart laboratuvar yemleri kullanıldı. Yeme ve içme *ad libitum* olarak sağlandı. Hayvanlar $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığa, $45 \pm 5\%$ nem oranına ve 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüye sahip ortamda barındırıldılar.

Deney Protokolü

Deneyde her birinde 7 hayvan bulunan 5 farklı grup oluşturuldu. Kontrol grubuna 28 gün boyunca 0,5 mL oral yolla serum fizyolojik verildi. RUT grubuna 30 gün boyunca 50 mg/kg RUT oral yolla verildi.²¹ DLM grubuna 30 gün boyunca 1,28 mg/kg DLM oral yolla verildi.²² DLM + RUT 25 grubuna 30 gün boyunca 1,28 mg/kg DLM oral yolla verildi. DLM uygulamasından 30 dakika sonra 25 mg/kg RUT yine oral yolla verildi. DLM + RUT 50 grubuna 30 gün boyunca 1,28 mg/kg DLM oral yolla verildi. DLM uygulamasından 30 dakika sonra 50 mg/kg RUT yine oral yolla verildi.

Son DLM uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra (31. gün) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek dalak dokuları alındı. Sonrasında dokular biyokimyasal analizler yapılana kadar -80°C saklandı.

Dalak Dokusunda Lipid Peroksidasyon Derecesi ve İndirgenmiş Glutasyon Seviyelerinin Analizi

Dalak dokuları $1,15\%$ lik KCl içerisinde homojenize edildikten sonra malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçümü için 3500 R.P.M'de 15 dakika, glutasyon (GSH) seviyelerinin tayini için ise 10000 R.P.M'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernantantta MDA seviyeleri Placer ve ark.'nın²³ geliştirdiği metot ile ölçüldü. GSH seviyeleri ise Sedlak ve Lindsay 'in²⁴ metoduna göre analiz edildi.

Dalak Dokusunda Total RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Real-Time PCR Analizleri

Dalak dokularında total RNA izolasyonu QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Cat: 79306, Germany) ile üreticinin protokolüne göre yapıldı.

Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop (Bio-Tek Instruments Epoch, USA) cihazında belirlendi ve alınan sonuçlara göre total RNA eşitlemesi yapıldı. Sonrasında total RNA'lardan iScript™ cDNA Synthesis Kit'i (Bio-Rad, United States) ile yine üretici firmanın vermiş olduğu talimatlar doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar nükleer faktör kappa B (NF- κ B) (F: AGTCCC GCCCTTCTAAAAC, R: CAATGGCCTCTGTGTAGCCC), interlökin-1-beta (IL-1 β) (F: ATGGCAACTGTCCCTGAACT, R: AGTGACACTGCCTTCCTGAA), mitojenle aktive olan protein kinaz 14 (MAPK14) (F: GTGGCAGTGAAGAAGCTGTC, R: GTCACCAGGTACACATCGTT), Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) (F: TTTCATCCAGGATCGAGCAG, R: AATCATCCTCTGCAGCTCCA), B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) (F: GACTTTGCAGAGATGTCCAG, R: GACTTTGCAGAGATGTCCAG), süperoksit dismutaz (SOD) (F: AATGTGGCTGCTGGAAAGGA, R: GCTTCCAGCATTCCAGTCT), katalaz (KAT) (F: CTGAGA-GAGTGGTACATGCA, R: AATCGGACGGCAATAGGAGT), glutasyon peroksidaz (GPx) (F: CAAGGTGCTGCTCATTGAGA, R: ATGTCGGA-ACTGATTGCACG) mRNA transkript seviyelerinin belirlenmesinde kullanıldı. RT-PCR aşamasında ilgili genlerin primerleri, QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Cat: 204143, Germany), RNaz free water ve cDNA'lar ile karışım hazırlandı. Sonrasında Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) ile üç tekrarlı olarak analiz işlemi yapıldı. İnternal kontrol olarak β -aktin (F: CAGCCTTCTTCTGGGTATG, R: AGCTCAGTAACAGTCCGCT) kullanıldı ve elde edilen CT değerlerinden Livak ve Schmittgen'in²⁵ $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ metodu ile kat değişimi hesaplamaları gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

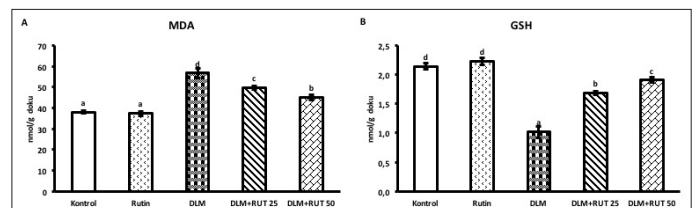
Dalak dokularında gerçekleştirilen analizlerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS programında versiyon 20.0 (IBM Statistical Package for the Social Sciences Corp., Armonk, NY, ABD) yapıldı. Deney grupları arasında istatistiksel farklar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılıklar ise Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. RT-PCR analizlerinde her örnek 3 tekrarlı çalışıldı ve sonuçlar ortalama \pm SD olarak sunuldu. $P < ,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

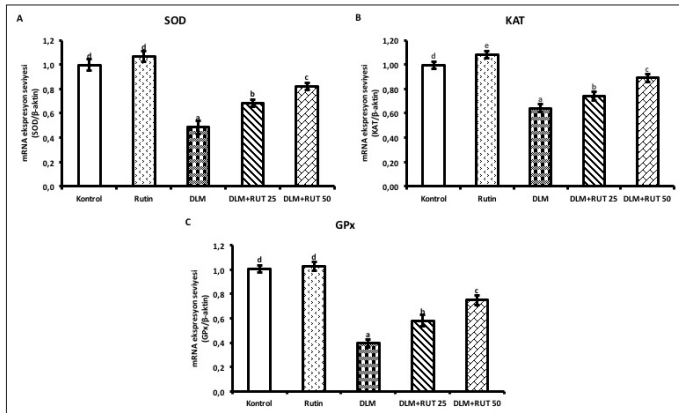
DLM ve RUT Uygulamalarının Dalak Dokusunda Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

DLM ve RUT uygulamalarının dalak dokusunda MDA ve GSH seviyeleri üzerine etkisi Şekil 1'de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre DLM'nin dalak dokusunda kontrol grubuna göre GSH seviyelerini azalttığı MDA seviyelerini ise arttırdığı belirlendi ($P < ,05$). Bununla birlikte RUT antioksidan etki göstererek lipid peroksidasyonunu doz bağımlı olarak azaltarak MDA seviyelerini kontrol grubuna yaklaştırdığı belirlendi ($P < ,05$). Ayrıca GSH seviyelerinin RUT uygulaması ile birlikte MDA seviyelerine ters korelasyon göstererek DLM grubuna göre arttığı görüldü ($P < ,05$).

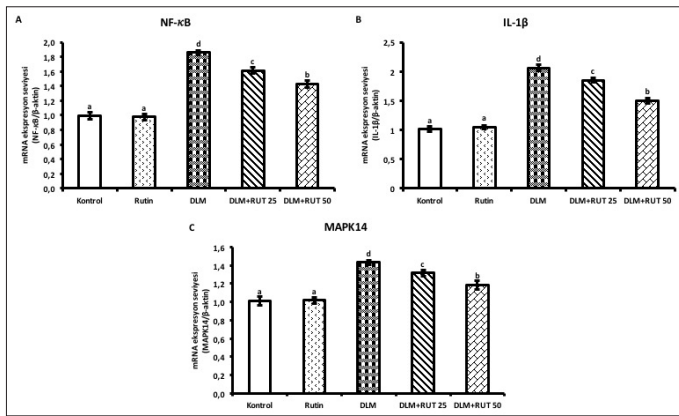
Oksidatif stres durumu ayrıca RT-PCR metodu kullanılarak SOD, KAT ve GPx enzimlerinin mRNA transkript seviyelerinin ölçülmesi



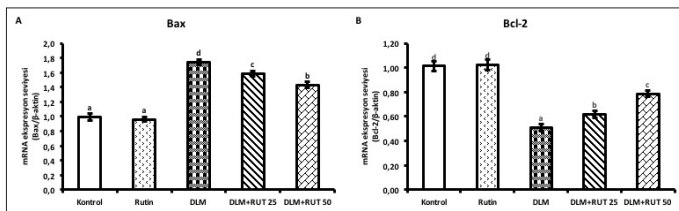
Şekil 1. Dalak dokusu MDA ve GSH seviyeleri
MDA, Malondialdehit; GSH, Glutasyon



Şekil 2. Dalak dokusu SOD, KAT ve GPx mRNA transkript seviyeleri SOD, Süperoksit dismutaz; KAT, Katalaz, GPx; glutatyon peroksizaz



Şekil 3. Dalak dokusu NF-κB, IL-1β ve MAPK14 mRNA transkript seviyeleri NF-κB, nüklear faktör kappa B; IL-1β, interlökin 1-beta; MAPK14, Mitojenle aktive olan protein kinaz 14



Şekil 4. Dalak dokusu Bax ve Bcl-2 mRNA transkript seviyeleri Bax, Bcl-2 ile ilişkili X proteini; Bcl-2, B hücreli lenfoma 2

ile araştırıldı ve sonuçlar Şekil 2'de verildi. DLM'nin SOD, KAT ve GPx ekspresyon seviyelerini baskılayarak oksidatif strese neden olduğu görülürken, Rutin uygulamasının bu antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını doz bağımlı olarak yukarı yönlü düzenlediği belirlendi.

DLM ve Rutin Uygulamalarının Dalak Dokusunda Enflamasyon Üzerine Etkileri

NF-κB, IL-1β ve MAPK14 inflamasyonda rol oynayan önemli belirteçlerdir. Dalak dokusunda bu yollara ait mRNA transkript seviyeleri değerlendirildiğinde DLM'nin NF-κB, IL-1β ve MAPK14 ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre önemli derecede arttırdığı belirlendi ($P < ,05$). DLM ile birlikte Rutin uygulanan ratların dalak dokularında bu belirteçlerin mRNA transkript seviyeleri incelendiğinde, DLM grubuna göre dikkate değer bir azalma mey-

dana geldiği gözlemlendi ($P < ,05$). Ayrıca 50 mg/kg verilen dozun 25 mg/kg'a göre inflamasyon üzerine daha etkili olduğu görüldü ($P < ,05$). Yalnızca Rutin uygulamasının ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturmadığı da elde ettiğimiz veriler arasındadır. NF-κB, IL-1β ve MAPK14 yollarına ait mRNA transkript seviyeleri Şekil 3'te özetlenmiştir.

DLM ve Rutin Uygulamalarının Dalak Dokusunda Apoptoz Üzerine Etkileri

Bax ve Bcl-2 apoptozda önemli rol oynayan proteinlerdir. Bu proteinlerin aktivasyon düzeylerine ait mRNA transkript seviyeleri değerlendirildiğinde, DLM uygulamasının dalak dokusunda Bax ekspresyonunu tetikleyerek Bcl-2 ekspresyonunu ise baskılayarak apoptozu neden olduğu tespit edildi ($P < ,05$). Bununla birlikte Rutin verilen ratların dalak dokusunda Bax ekspresyonunun doz bağımlı olarak baskılandığı belirlendi ($P < ,05$). Ayrıca Rutin uygulamasının Bcl-2 mRNA transkript seviyelerini yine doz bağımlı olarak arttırdığı görüldü ($P < ,05$). Bax ve Bcl-2'nin dalak dokusundaki mRNA transkript seviyeleri Şekil 4'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Sunulan çalışmada ratların dalak dokularında DLM ile toksisite oluşturulduktan sonra Rutin'un potansiyel koruyucu etkileri oksidatif stres, enflamasyon ve apoptoz üzerinden araştırıldı.

Oksidatif metabolizmanın yan ürünleri olan süperoksitler, peroksitler ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROT), hücrelerde yer alan nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi makro moleküllerle hasar vererek dokuların işlevlerinin kaybolmasına neden olur ve böylece birçok hastalığın patogenezini oluşturur.^{10,26} Normal şartlar altında her zaman düşük seviyelerde üretilen bu ROT'lar vücutta yer alan antioksidan savunma sistemi tarafından temizlenerek oksidan-antioksidan denge kurulmaktadır.²⁷ Örneğin süperoksit radikali SOD tarafından hidrojen peroksit, hidrojen peroksit ise KAT ve GPx tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir.²⁸ Ayrıca önemli bir antioksidan tripeptid olan GSH serbest radikalleri bağlayarak okside forma (GSSG) dönüşerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır.²⁶ Bununla birlikte DLM'nin de aralarında bulunduğu çeşitli ajanlar tarafından oksidatif stres yüksek derecede meydana geldiğinde oksidan-antioksidan denge bozulmakta ve dalak dahil birçok dokuda toksisite meydana gelmektedir.²⁹⁻³⁴ Sunulan çalışmada da DLM'nin dalak dokusunda muhtemelen serbest radikal oluşumunu artırarak GSH depolarının tükenmesine neden olduğu görüldü. Ayrıca DLM'nin antioksidan enzimlerin aktivitelelerinde azalmaya neden olduğu da belirlendi. Öte yandan önemli bir antioksidan madde olan Rutin'un antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını aktive ettiği ve GSH depolarının yenilediği tespit edildi. Böylece dalak dokusunda lipid peroksidasyonunun hafifleyerek MDA seviyelerinin azaldığı görüldü. Önceki çalışmalarda da Rutin uygulamasının çeşitli toksik ajanlar tarafından meydana gelen oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir.^{13,16}

Oksidatif stres ve enflamatuar yanıt arasında yer alan bağlantıya dair kanıtlar giderek artmaktadır.¹¹ NF-κB, hücre göçü, hücre dönüşümü kontrolü, apoptoz ve enflamasyon da dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreci düzenleyen bir transkripsiyon faktörleri ailesidir.^{17,35,36} NF-κB kaskadının çeşitli enflamatuar durumların patofizyolojisinin temelinde yer aldığı ve oksidatif stresin, sitokinlerin ve MAPK14'ün bu kaskadı anormal şekilde aktive ettiği bilinmektedir.^{13,37} IL-1β'nin de aralarında bulunduğu pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonlarını tetikleyerek enflamatuar süreci başlattığından dolayı NF-κB'nin aktivasyonunun uygun bir şekilde inhibe edilmesi büyük önem arz etmektedir.¹⁷ Önceki çalışmalarda çeşitli

toksik ajanların MAPK14 ve NF- κ B aktivasyonuna neden olarak IL-1 β seviyelerinde artışa neden olduğu ve böylece enflamatuar süreci aktive ederek doku hasarına yol açtığı bildirilmiştir.^{38,39} Sunulan çalışmada da ratlara DLM uygulaması ile dalak dokusunda MAPK14 ve NF- κ B'nin mRNA transkript seviyelerinde önemli artışların meydana geldiği ve muhtemelen buna bağlı olarak IL-1 β 'nin ekspresyonunu tetikleyerek enflamasyon meydana geldiği belirlendi. RUT uygulamasının ise oksidatif stresi hafifleterek NF- κ B ekspresyonunu baskıladığı ve böylece IL-1 β 'nin mRNA transkript seviyelerini azalttığı görüldü. Önceki çalışmalarda RUT ile benzer özelliklere sahip doğal antioksidanların aynı şekilde oksidatif stresi azalttığı ve enflamasyonu hafiflettiği böylece hedef dokuları toksik ajanların hasarından koruduğu bildirilmiştir.⁴⁰

Programlanmış hücre ölümü olgusu olan apoptoz, çeşitli kimyasallar veya çevresel uyaranlar tarafından tetiklenen hücrenel bir süreçtir ve hücrenel homeostazın kontrolünde önemli bir role sahiptir.^{11,39} Ayrıca apoptotik süreçte mitokondride üretilen ROS'lar önemli bir görev almaktadır.⁴¹ Mitokondriyal membran geçirgenliği, özellikle anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax proteinleri dahil olmak üzere Bcl-2 proto-onkogen ailesi tarafından kontrol edilir.^{10,12,42} Bax'ın aktivasyonu ile mitokondriye girmesi, membran geçirgenliğinin bozulmasına neden olur. Bu, apoptotik sürecin başlamasına büyük ölçüde katkıda bulunan kaspazların sitokrom c salınımına ve aktivasyonuna yol açar.^{10,42} Bcl-2 proteini, Bax'ı inaktive ederek membran potansiyelini artırır ve apoptotik süreci baskılar.^{42,43} Ayrıca MAPK14 yolunun apoptotik yolda kaspaz-3 aktivasyonu sağladığı ve apoptoz sürecini hızlandırdığı bildirilmiştir.^{39,44} Daha önce yapılan bir çalışmada DLM'ye maruz kalmanın hücre sağkalımını önemli ölçüde etkilediğini ve splenositlerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir.⁴⁵ Sunulan çalışmada da DLM uygulamasının dalak dokusunda MAPK14'ün ve Bax'ın mRNA transkript seviyelerini artırdığı bununla birlikte Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı böylece dalak dokusunda apoptozu neden olarak toksisiteye önemli katkı sağladığı belirlendi. Öte yandan RUT tedavisinin Bax ve MAPK14 ekspresyonlarını baskılayarak Bcl-2 ekspresyonunu ise aktive ederek apoptozu baskıladığı ve böylece dalak dokusunu DLM'nin yıkıcı etkisinden koruduğu görüldü. Önceki çalışmalarda toksik ajanların tetiklediği apoptotik yolu fitokimyasalların baskıladığı ve böylece hedef dokuları bu toksik ajanların oluşturacağı hasardan koruduğu bildirilmiştir.^{9,13,30}

Sonuç olarak, RUT tedavisinin oksidatif stresi, enflamasyonu ve apoptozu hafifleterek dalak dokusunu DLM'nin yıkıcı etkisinden koruduğu sonucuna varıldı.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Atatürk Üniversitesi'nden (Tarih: 29 Mayıs 2020, Protokol No: 2020-05-78) alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – C.G.; Tasarım – C.G., A.G.; Denetleme – Ö.K., C.G.; Kaynaklar – C.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – C.G.; Analiz ve/veya Yorum – C.G.; Literatür Taraması – A.G., Ö.K.; Yazıyı Yazan – C.G.; Eleştirel İnceleme – Ö.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Atatürk University (Date: May 29, 2020, Protocol Number: 2020-05-78).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – C.G.; Design – C.G., A.G.; Supervision – Ö.K., C.G.; Resources – C.G.; Data Collection and/or Processing – C.G.; Analysis and/or Interpretation – C.G.; Literature Search – A.G., Ö.K.; Writing Manuscript – C.G.; Critical Review – Ö.K.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

- Ahmadipour A, Sharififar F, Pournamdari M, et al. Hepatoprotective effect of Zataria Multiflora Boiss against malathion-induced oxidative stress in male rats. *Orient Pharm Exp Med*. 2016;16:287-293. [\[Crossref\]](#)
- Bhardwaj JK, Saraf P. Malathion-induced granulosa cell apoptosis in caprine antral follicles: an ultrastructural and flow cytometric analysis. *Microsc Microanal*. 2014;20(6):1861-1868. [\[Crossref\]](#)
- Abdel-Daim MM, Abuzead SM, Halawa SM. Protective role of Spirulina platensis against acute deltamethrin-induced toxicity in rats. *PLoS One*. 2013;8:e72991. [\[Crossref\]](#)
- Lu Q, Sun Y, Ares I, et al. Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environ Res*. 2019;170:260-281. [\[Crossref\]](#)
- Maalej A, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Fki I, Marrekchi R, Sayadi S. Olive and phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2017;106:455-465. [\[Crossref\]](#)
- Jindal R, Sinha R, Brar P. Evaluating the protective efficacy of Silybum marianum against deltamethrin induced hepatotoxicity in piscine model. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019;66:62-68. [\[Crossref\]](#)
- Bagherpour H, Malekshah AK, Amiri FT, Azadbakht M. Protective effect of green tea extract on the deltamethrin-induced toxicity in mice testis: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 2018;17(5):337-348. [\[Crossref\]](#)
- Aksu EH, Kandemir FM, Küçükler S. Ameliorative effect of hesperidin on streptozotocin-diabetes mellitus-induced testicular DNA damage and sperm quality degradation in Sprague-Dawley rats. *J Food Biochem*. 2021;45(10):e13938. [\[Crossref\]](#)
- Caglayan C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Küçükler S, Ayna A. Hesperidin protects liver and kidney against sodium fluoride-induced toxicity through anti-apoptotic and anti-autophagic mechanisms. *Life Sci*. 2021;281:119730. [\[Crossref\]](#)
- Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, et al. Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28:49808-49819. [\[Crossref\]](#)
- Kucukler S, Benzer F, Yildirim S, et al. Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199:1501-1514. [\[Crossref\]](#)
- Yardim A, Kandemir FM, Ozdemir S, et al. Quercetin provides protection against the peripheral nerve damage caused by vincristine in rats by suppressing caspase 3, NF- κ B, ATF-6 pathways and activating Nrf2, Akt pathways. *Neurotoxicology*. 2020;81:137-146. [\[Crossref\]](#)
- Kandemir FM, Caglayan C, Aksu EH, et al. Protective effect of rutin on mercuric chloride-induced reproductive damage in male rats. *Andrologia*. 2020;52(3):e13524. [\[Crossref\]](#)
- Kandemir FM, Hanedan B, Aktaş MS, Küçükler S, Çağlayan C. Ratlarda Sisplatinin Kaynaklanan Nefrotoksisite Üzerine Rutinin İyileştirici Etkileri. *Firat Univ Vet J Health Sci*. 2020;34:147-151.
- Genc M, Kandemir F, Coban O. Effects of In-Ovo Rutin Injection to Fertile Japanese Quail (Coturnix Coturnix Japonica) Egg on Hatchability, Embryonic Death, Hatchling Weight, and Hatchling Liver Oxidative and Nitrosative Stress. *Braz J Poultry Sci*. 2019;21(1): DOI:10.1590/1806-9061-2018-0786. [\[Crossref\]](#)

16. Caglayan C, Kandemir FM, Darendelioğlu E, Yıldırım S, Kucukler S, Dortbudak MB. Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biol Trace Elem Res.* 2019;56:60-68. [\[Crossref\]](#)
17. Caglayan C, Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Eser G. Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2019;54:69-78. [\[Crossref\]](#)
18. Aktaş MS, Kandemir FM, Özkaraca M, Hanedan B, Kırbaş A. Protective effects of rutin on acute lung injury induced by oleic acid in rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2017;23(3):443-451.
19. Aksu E, Kandemir F, Özkaraca M, Ömür A, Küçükler S, Çomaklı S. Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. *Andrologia.* 2017;49:e12593. [\[Crossref\]](#)
20. Kandemir FM, Ozkaraca M, Yıldırım BA, et al. Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. *Renal Failure.* 2015;37(3):518-525. [\[Crossref\]](#)
21. Manzoni AG, Passos DF, da Silva JL, et al. Rutin and curcumin reduce inflammation, triglyceride levels and ADA activity in serum and immune cells in a model of hyperlipidemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2019;76:13-21. [\[Crossref\]](#)
22. Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology.* 2006;227(3):240-247. [\[Crossref\]](#)
23. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.* 1966;16(2):359-364. [\[Crossref\]](#)
24. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192-205. [\[Crossref\]](#)
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. [\[Crossref\]](#)
26. El-Shenawy NS. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro.* 2010;24(4):1148-1157. [\[Crossref\]](#)
27. Gur C, Kandemir FM, Aydın G. Bortezomib ile kalp hasarı oluşturulan ratlarda berberinin oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi.* 2020;9(2):118-126. [\[Crossref\]](#)
28. Elbetieha A, Da'as SI. Assessment of antifertility activities of abamectin pesticide in male rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003;55(3):307-313. [\[Crossref\]](#)
29. İleritürk M, Doğan T, Kandemir O. Investigation of the effect of berberine with arginase activity and oxidant/antioxidant parameters on bortezomib-induced spleen injury in rats. *Kocatepe Vet J.* 2021;14(1):6-15. [\[Crossref\]](#)
30. İleritürk M, Benzer F, Aksu EH, et al. Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties. *J Food Biochem.* 2021;45(2):e13593. [\[Crossref\]](#)
31. Küçükler S, Çomaklı S, Özdemir S, Çağlayan C, Kandemir FM. Hesperidin protects against the chlorpyrifos-induced chronic hepato-renal toxicity in rats associated with oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and up-regulation of PARP-1/VEGF. *Environ Toxicol.* 2021;36(8):1600-1617. [\[Crossref\]](#)
32. Kumar A, Sasmal D, Sharma N. Mechanism of deltamethrin induced thymic and splenic toxicity in mice and its protection by piperine and curcumin: in vivo study. *Drug Chem Toxicol.* 2018;41(1):33-41. [\[Crossref\]](#)
33. Coşkun P, Benzer F, Kandemir F, Yıldırım S, Küçükler S. Ratlarda kurşun asetat kaynaklı karaciğer hasarı üzerine Chrysin'in etkilerinin araştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi.* 2021;8(2):250-261. [\[Crossref\]](#)
34. Sakat MS, Kılıç K, Akdemir FNE, Yıldırım S, Eser G, Kızıltunç A. The effectiveness of eugenol against cisplatin-induced ototoxicity. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2019;85(6):766-773. [\[Crossref\]](#)
35. Özdemir S, Küçükler S, Çomaklı S, Kandemir FM. The protective effect of Morin against ifosfamide-induced acute liver injury in rats associated with the inhibition of DNA damage and apoptosis. *Drug Chem Toxicol.* 2020;1-10. [\[Crossref\]](#)
36. Küçükler S, Özdemir S, Çomaklı S, Kandemir F. Ratlarda izoniazid kaynaklı akciğer hasarına karşı krisinin etkileri. *Kocatepe Vet J.* 2020;13(2):161-171.
37. Temel Y, Küçükler S, Yıldırım S, Çağlayan C, Kandemir FM. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(3):325-337. [\[Crossref\]](#)
38. Benzer F, Kandemir FM, Özkaraca M, Küçükler S, Çağlayan C. Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018;32(2):e22030. [\[Crossref\]](#)
39. Çelik H, Küçükler S, Özdemir S, et al. Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. *Neurotoxicology.* 2020;80:29-40. [\[Crossref\]](#)
40. Kandemir FM, Yıldırım S, Çağlayan C, Küçükler S, Eser G. Protective effects of zingerone on cisplatin-induced nephrotoxicity in female rats. *Environ Sci Pollut Res.* 2019;26(22):22562-22574. [\[Crossref\]](#)
41. Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Caglayan C, Darendelioğlu E, Dortbudak MB. Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach. *Food Chem Toxicol.* 2020;138:111190. [\[Crossref\]](#)
42. Thangarajan S, Vedagiri A, Somasundaram S, Sakthimanogaran R, Murugesan M. Neuroprotective effect of morin on lead acetate-induced apoptosis by preventing cytochrome c translocation via regulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Neurotoxicol Teratol.* 2018;66:35-45. [\[Crossref\]](#)
43. Aksu EH, Kandemir FM, Küçükler S, Mahamadu A. Improvement in colistin-induced reproductive damage, apoptosis, and autophagy in testes via reducing oxidative stress by chrysin. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018;32(11):e22201. [\[Crossref\]](#)
44. Chen YJ, Chen HP, Cheng YJ, et al. The synthetic flavonoid WYC02-9 inhibits colorectal cancer cell growth through ROS-mediated activation of MAPK14 pathway. *Life Sci.* 2013;92(22):1081-1092. [\[Crossref\]](#)
45. Kumar A, Sasmal D, Bhaskar A, Mukhopadhyay K, Thakur A, Sharma N. Deltamethrin-induced oxidative stress and mitochondrial caspase-dependent signaling pathways in murine splenocytes. *Environ Toxicol.* 2016;31(7):808-819. [\[Crossref\]](#)

Evaluation of Interleukin and Vitamin Levels in Sheep Infested with *Sarcoptes Scabiei*

Sarcoptes Scabiei ile Enfeste Koyunlarda İnterlökin ve Vitamin Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Pelin Fatoş POLAT DİNÇER¹ 
Ömer Faruk GÖKCECİK² 
Alper BAŞA³ 

¹Department of Internal Medicine, Dokuz Eylül University, Faculty of Veterinary Medicine, İzmir, Turkey
²Department of Parasitology, Bornova Veterinary Control Institute, İzmir, Turkey
³Akçakale Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, Şanlıurfa, Turkey

ABSTRACT

This study determined the levels of Vitamin E, 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃), interleukin-2 (IL-2), and interleukin-4 (IL-4) in sheep naturally infected with *Sarcoptes scabiei* (*S. scabiei*). It also determined the dominant cytokine response and investigated its relationship with 25(OH)D₃. For this purpose, 20 sheep between the ages of 1-4 years, naturally infected with *S. scabiei*, with crusted wounds were compared with 10 healthy sheep in the same age range. Five ml of blood was collected from each animal and stored at -20 °C until the serum was analyzed. To detect scabies, scrapings were taken and examined under a microscope. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine IL-2 and IL-4 serum levels, high-performance liquid chromatography (HPLC) for Vitamin E analysis, and immunoassay for 25(OH)D₃ determination. Vitamin E and 25(OH)D₃ levels were significantly lower in infected sheep compared to the control group ($P < .05$) whereas the IL-4 level of the infected animals was significantly higher ($P < .05$) compared to the control group. There was no significant difference between the groups for IL-2 level ($P > .05$). In conclusion, serum vitamin E and 25(OH)D₃ levels were lower in crusted scabies in sheep infected with *S. scabiei*, T lymphocytes had a critical role, and the immune response was in the direction of Th2.

Keywords: Interleukin, vitamin E, 25-hydroxyvitamin D

ÖZ

Çalışmanın amacı *S. scabiei* ile doğal enfekte koyunlarda vitamin E, 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃), interleukin-2 (IL-2) ve interleukin-4 (IL-4) seviyelerinin tespit edilmesi ayrıca baskın sitokin yanıtının belirlenerek 25(OH)D₃ ile ilişkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, 1-4 yaşları arasında *S. scabiei* ile doğal enfekte, kabuklu yaralara sahip 20 ve kontrol grubu olarak aynı yaş aralığında sağlıklı 10 koyun kullanıldı. Her hayvandan 5 ml kan alınıp serumları analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı. Uyuz akarlarının tespiti için kazıntı alınarak mikroskopta muayene edildi. Serumda IL-2 ve IL-4 tayini enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), E vitamini analizleri için high-performance liquid chromatography (HPLC) ve 25 (OH)D₃ tayini için immunoassay kullanıldı. E vitamini ve 25(OH)D₃ seviyelerinin enfekte koyunlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı ($P < .05$) görüldü. Enfekte hayvanların IL-4 seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış ($P < .05$) gösterirken, IL-2 seviyesinde gruplar arasında istatistiksel fark tespit edilmedi ($P > .05$). Sonuç olarak, *S. scabiei* ile enfekte koyunlarda meydana gelen kabuklu uyuzlarda serum E vitamini ve 25(OH)D₃ düzeylerinin azaldığı, T lenfositlerin kritik rolünün olduğu ve immun yanıtın Th2 yönünde olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İnterlökin, E Vitamini, 25-hidroksivitamin D

Received/Geliş Tarihi: 22.08.2021

Accepted/Kabul Tarihi: 04.01.2022

Corresponding Author/Sorumlu Yazar:
Pelin Fatoş POLAT DİNÇER
E-mail: pelinfatos.polat@deu.edu.tr

Cite this article: Polat Dinçer PF, Gökcecik ÖF, Başa A. Evaluation of interleukin and vitamin levels in sheep infested with *sarcoptes scabiei*. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 11-15.

Atif: Polat Dinçer PF, Gökcecik ÖF, Başa A. *Sarcoptes Scabiei* ile Enfeste Koyunlarda İnterlökin ve Vitamin Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *Vet Sci Pract.* 2022;17(1), 11-15.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

INTRODUCTION

Sarcoptic mange is a parasitic skin disease caused by the *Sarcoptes scabiei* (*S. scabiei*) mite. In sheep, lesions characterized by the formation of crusts up to 1 cm thick are mainly located in the head region.¹ The main clinical symptom is rubbing and itching as well as dry skin, dandruff, and cracks. Epidemics, which appear every season when sheep numbers are high, cause significant financial losses due to low feed efficiency and birth weight, poor fleece quality, and deaths in advanced cases.²

When the mite infects the host, a process begins between the mite and the skin, which determines the course of infestation and the severity of clinical symptoms. When scabies mites enter the skin, they secrete substances that induce inflammatory and immune responses, as well as substances

that allow the mite to circumvent the host's protective mechanisms and suppress certain aspects of the host. As the infestation progresses and the mites multiply, the host's immune system is activated. Located under the epidermis, the mites release antigenic and pharmacologically active substances (saliva, molting enzymes and hormones, feces and nitrogen) that are dispersed into the fluid between the epidermal and dermal cells. These substances induce responses from keratinocytes, fibroblasts, macrophages, mast cells, lymphocytes, langerhans cells, dendritic cells, and microvascular-type endothelial cells.³

Histopathological examination of skin biopsies taken from scabies lesions show inflammatory cell infiltrates containing eosinophils, lymphocytes, and macrophages around the cavities caused by scabies.⁴ The predominant lympho-

cytes in the infiltrate are T lymphocytes, which play a central role in the activation and regulation of immune responses by recognizing antigens and inducing cytokine production. Keratinocytes produce proinflammatory cytokines while immunomodulatory cytokines are responsible for systemic effects.^{5,6} Eosinophils are multifunctional leukocytes that play a role in the pathogenesis of numerous inflammatory processes, including parasitic infestations and allergic disorders.⁷ They secrete a number of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12) that can promote T cell proliferation, activation, and Th1/Th2 polarization.^{8,9}

Studies have reported a link between the presence of Vitamin D receptors (VDR) in various immune cells, such as monocytes, macrophages, and activated T and B cells, and the immune system.¹⁰ Vitamin D inhibits T cell proliferation and the production of cytokines, such as interleukin-2 (IL-2), interleukin-12 (IL-12), and Interferon Gamma (IFN- γ) in vitro. Stimulation of Th2 cells to produce anti-inflammatory cytokines (TGF- β -1, IL-1, IL-4) produces anti-inflammatory effects both in vivo and in vitro.^{11,12}

Free radicals are reactive molecules produced in different metabolic processes in the body. Antioxidant vitamins like Vitamin E prevent free radical formation.¹³ In addition, Vitamin E is very important for cellular and humoral immunity because it modulates Th1 and Th2 responses with its effects on polarization from CD4+ T cells to Th1 or Th2 cells, protection against intracellular and extracellular pathogens, and the development of different types of chronic diseases (inflammatory and allergic diseases).¹⁴

This study aimed to measure levels of Vitamin E, 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃), IL-2, and IL-4 in sheep naturally infected with *S. Scabiei*, determine the dominant cytokine response. The results can contribute to pathobiological knowledge of the disease and treatment and prophylaxis of sheep infected with *S. scabiei*.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Study Design

Twenty sheep between the ages of 1-4 years, naturally infected with *S. scabiei* and with crusted wounds were compared to 10 healthy sheep in the same age range. None of the animals had been treated with corticosteroids or vitamins. Five ml of blood was collected from the V. jugularis of the sheep in yellow-capped (BD Vacutainer® SST™II Advance) tubes. After the blood samples were centrifuged (Nuve, NF 800R, Turkey) at 3000rpm/10min serum samples were stored at -20 °C until analysis. Before starting the study, ethical approval was obtained from Dokuz Eylül University Animal Experiments Local Ethics Committee, dated 14.07.2021, decision number 42/2021.

Skin Scraping Examination

To detect scabies mites, skin scraping samples were taken from at least two different areas and a 1 cm² area adjacent to healthy tissue.¹⁵ The scraping samples were taken in 10% KOH and kept at 37°C for 1 day. After centrifugation (Thermo Fisher Scientific, Germany) at 3000 rpm / 3 min, the precipitate was examined under a microscope (Olympus, SZX7, Japan) at x4 and x10 magnification.¹⁶

Evaluation of Immune and Vitamin Profile

Sheep IL-2 ELISA kit (E0029Sh, Bioassay Technology Laboratory, China) and sheep IL-4 ELISA kit (E0079Sh, Bioassay Technology Laboratory, China) were used to measure IL-2 and IL-4 serum lev-

els. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analyses were performed in accordance with the kit supplier's instructions. For the detection of 25(OH)D₃, a serum sample chromatography (HPLC) instrument was used (Shimadzu OGU-20A, Japan) while a high performance liquid was used for Vitamin E analysis from the Immunoassay instrument (Siemens AdviaCentaur XP, Germany).

Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using IBM Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Armonk, NY, USA) version 22. Both visual (histograms, probability plots) and analytical methods (Kolmogorov-Smirnov) were used to determine whether the variables were normally distributed. Student's t-test was used for the normally distributed vitamin and cytokine parameters. A p value less than .05 was considered a statistically significant result.¹⁷

RESULTS

Under microscopic examination of the scraping samples, the active ingredient *Sarcoptes scabiei* var. *ovis* was detected (Figure 1). Hypersensitivity, alopecia, pruritis, crust formation, and deep skin cracks were observed macroscopically, especially in the face and ears of the all infected sheep. Vitamin E levels were significantly lower ($P < .05$) in the infected sheep (0.51 ± 0.15 mg/L) compared to the control group (1.45 ± 0.30 mg/L) (Figure 2). Similarly, 25(OH)D₃ levels were significantly lower ($P < .05$) in the infected sheep (26.16 ± 1.04 ng/mL) compared to the control group (66.29 ± 4.45 ng/mL) (Figure 3). Conversely, IL-4 interleukin levels were significantly higher ($P < .05$) in the infected animals (35.26 ± 5.08 ng/L) compared to the control group (22.76 ± 2.86 ng/L). For IL-2, however, there was no significant difference ($P > .05$) in levels in the infected sheep (14.41 ± 2.28 ng/L) and control group (12.50 ± 2.31 ng/L) (Figure 4).

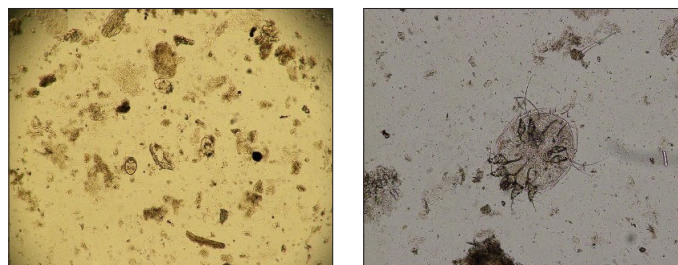


Figure 1. Microscope image of *S. scabiei* (magnification 4 \times and 10 \times)

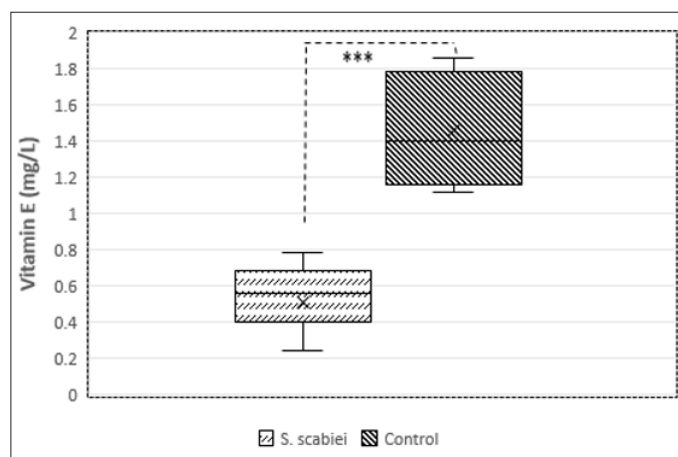


Figure 2. Serum vitamin E level in sheep infected with *S. scabiei*. Bars represent mean \pm SE, *** $< .05$.

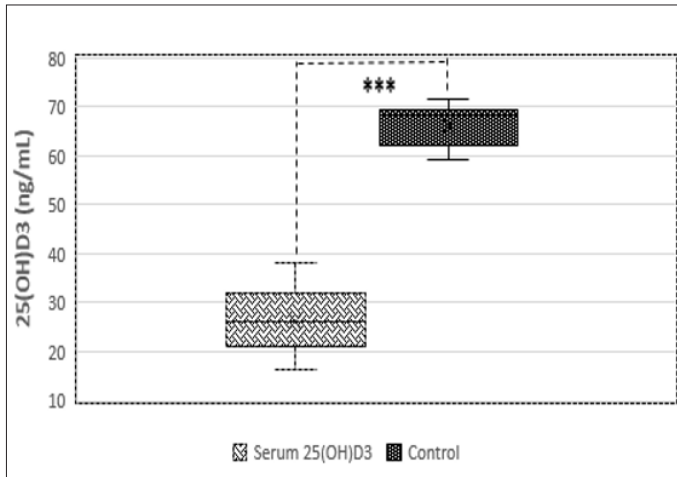


Figure 3. Serum 25 (OH)D₃ level in sheep infected with *S. scabiei*. Bars represent mean \pm SE, *** < .05.

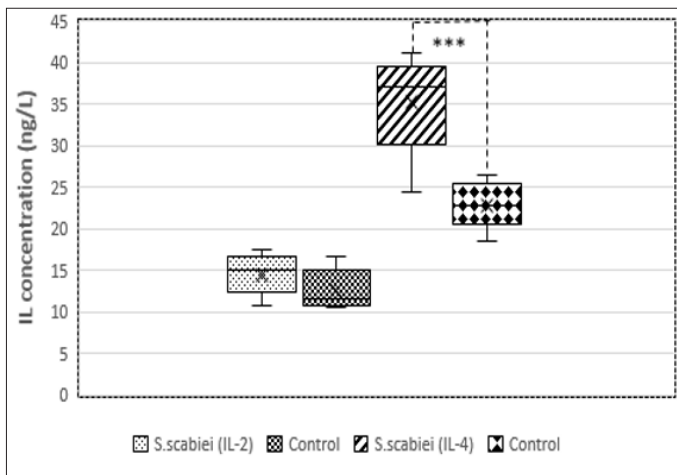


Figure 4. Serum interleukin levels in sheep infected with *S. scabiei*. Bars represent mean \pm SE, *** < .05.

DISCUSSION

Parasitic skin disease caused by the *S. scabiei* mite causes severe epidemics that result in economic losses due to low milk production and wool quality, growth retardation in newborn lambs, and death in advanced cases.² In addition, animal welfare is reduced by severe itching and rubbing symptoms.

Cytokine secretion from T lymphocytes plays an important role in the immune response to parasitic skin infestations. Evaluation of cytokine profiles in sheep naturally infected with *S. scabiei* is important for understanding the pathobiology of scabies. Therefore, this study investigated cytokine profiles and Vitamin E and 25(OH) D₃ levels, which are closely related to immune system function, in sarcoptic sheep.

In line with previous studies, Vitamin E levels were significantly lower in sheep with *S. scabiei* compared to the control group. Bickhardt et al.¹⁸ examined Vitamin E levels in 125 sheep and 32 goats between 1991 and 1998 with general motor disorders or high plasma creatine kinase. They reported deficient Vitamin E levels below 1.0 mg/l. Based on this data, sheep with *S. scabiei* may suffer severe Vitamin E deficiency. Similarly, Dimri et al.¹³ reported severe Vitamin E deficiency and high mortality in a herd

of cows infested with sarcoptic mange. Regarding immunity, dietary Vitamin E supplements increase cell-mediated and humoral immune responses in various animal species, and increased lymphocyte proliferation, immunoglobulin levels, antibody responses, natural killer (NK) cell activity, and IL-2 production.¹⁹ Li-Weber et al.²⁰ treated allergic donors with Vitamin E and reported a decrease in IL-4 production. Malmberg et al.²¹ reported that the frequency of CD4+ T cells producing IL-2 and the production of IFN- γ increased in colorectal cancer patients after two weeks of 750 mg Vitamin E supplementation. Han et al.²² reported increased Th1 response and decreased viral titer in old mice lungs following 500 ppm Vitamin E supplementation eight weeks before infection with influenza virus.

In our study, 25(OH)D₃ levels were significantly lower in sheep naturally infected with *S. scabiei* compared to the control group. Similarly, Ural et al.²³ reported significantly lower 25(OH)D₃ levels compared to the control group of 28 sheep infected with *S. scabiei* Başbuğ et al.²⁴ found 25(OH)D₃ levels were lower in 14 sheep with caseous lymphadenitis compared to the control group.

The functional integration of the immune system is mainly accomplished by cell-to-cell communication based on small molecule cytokines.²⁵ Th1 lymphocytes are characterized by the production of IFN- γ and IL-2 cytokines while Th2 lymphocytes are characterized by the production of IL-4 and IL-5 related to the humoral immune response.²⁶ Th1 and Th2 cells are seen in almost all known immune response patterns. Th1 cells are hypothesized to lead the attack against intracellular pathogens, such as viruses, increase the classical delayed-type hypersensitivity skin response to viral and bacterial antigens, and fight cancer cells. Th2 cells are believed to provide protection against extracellular pathogens, such as multicellular parasites.²⁵

Scabies infestation impairs the Th1/Th2 immune response.²⁷ In our study, IL-4 levels were significantly lower in sheep with crusted wounds infected with *S. scabiei* compared to the control group. The dominant cytokine response in this disease is in the direction of Th2 while various studies have reported overproduction of Th2 specific cytokines and increased allergic immune response to sarcoptes.^{5,26,28-30} Sarre et al.³¹ performed transcriptional analysis of skin biopsies from cattle with psoroptic crustacean scabies, and found similarly increased expression of IL-4, IL-5, and IL-13. Singh et al.²⁶ reported that IL-4 and IL-5 production increases in dogs naturally infected with *S. scabiei* var. *Canis*, which plays a role in the immunopathogenesis of dogs. Bayraktar et al.³² found a 65.7% increase in IL-4 and a 46.8% increase in IL-2 levels in people infected with cystic echinococcosis.

In contrast to our findings, Al-Musawi et al.⁹ investigated the immune response in 60 cases of scabies, of which 30 were early and 30 late. They reported that the host immune response was similar to the Th2 allergic response in patients with early scabies, while it was in the form of a Th1 cell-mediated immune response in late scabies patients. The increase in IL-4 levels in sheep infected with *S. scabiei* helps recruit B cells, mast cells, and eosinophils that can produce IgE antibodies, which play an important role in inducing allergic symptomatology.³³ In particular, eosinophils are produced in large amounts in inflammatory areas under allergic conditions and helminth infestations.³⁴ Eosinophils also express Th2-specific cytokines.³⁵ Van den Broek et al.³⁶ determined that the dominant immune inflammatory infiltrate in sheep infected with *Psoroptes ovis* was eosinophil. This explains the Th2-directed immune response in sheep infected with *S. scabiei*.

The active form of Vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), is an endocrine regulator of calcium homeostasis. Recent studies have shown that local production of 1,25(OH)₂D₃ by immune cells has autocrine and paracrine immunomodulatory effects. T cells cause an increase in IL-4 and IL-5 but a decrease in IL-2 and IFN γ , which reduces the Th1/Th2 response.³⁷ Based on the ability of 1,25(OH)₂D₃ to suppress the development of various autoimmune diseases and prolong allograft survival, it was named 1,25(OH)₂D₃ immunosuppressive hormone.³⁸ Smolders et al.³⁹ investigated the effect of high Vitamin D levels in multiple sclerosis (MS) patients and found that the dominant response in Th1/Th2 balance was Th2 while Vitamin D could provide important support for MS patients. However, Vitamin D has no effect on the susceptibility of mice to Herpes simplex virus or Candida albicans infections.⁴⁰ Meckel et al.⁴¹ reported a relationship between inflammation and low serum 25(OH)D₃.

Little is known about the role of Vitamin D in regulating immune responses to infectious diseases. Other than the ability of this nutrient or hormone to suppress autoimmune diseases and prolong transplantation, most of what is known is open to further research.³⁸ Jiao et al.⁴² found a decrease in IFN- γ and Th1/Th2 levels and an increase in IL-4 levels in rats with Vitamin D deficiency whereas the opposite was true for rats that received Vitamin D supplementation during pregnancy.⁴¹

In conclusion, regarding sheep with crusted scabies infected with *S. Scabiei*, this study showed that serum Vitamin E and 25(OH)D₃ levels decreased, T lymphocytes played a critical role, and a Th2 immune response occurred.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Dokuz Eylül University (Date: July 14, 2021, Decision Number: 42/2021).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – P.F.P.D.; Design – P.F.P.D.; Supervision – P.F.P.D.; Resources – P.F.P.D.; Data Collection and/or Processing – A.B., Ö.F.G.; Analysis and/or Interpretation – P.F.P.D.; Literature Search – P.F.P.D.; Writing Manuscript – P.F.P.D.; Critical Review – P.F.P.D., Ö.F.G.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Dokuz Eylül Üniversitesi'nden (Tarih: 14 Temmuz 2021, Karar No: 42/2021) alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – P.F.P.D.; Tasarım – P.F.P.D.; Denetleme – P.F.P.D.; Kaynaklar – P.F.P.D.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – A.B., Ö.F.G.; Analiz ve/veya Yorum – P.F.P.D.; Literatür Taraması – P.F.P.D.; Yazıyı Yazan – P.F.P.D.; Eleştirel İnceleme – P.F.P.D., Ö.F.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.


REFERENCES

- Cordero del Campillo M, Rojo-Vazquez FA. *Parasitologia Veterinaria*. 1st edn., McGraw-Hill Interamericana, Spain, 1999.
- Doukas D, Liakou Z, Tontis D. Sarcophages scabiei dermatitis in adult sheep: an immunohistochemical study of 34 chronic cases with extensive lesions. *J Hell Vet Medical Soc*. 2021;72(1):2755-2764. [Crossref]
- Arlian LG, Morgan MS. A review of Sarcophages scabiei: past, present and future. *Parasites & Vectors*. 2017;10(1):1-22. [Crossref]
- Walton SF, Currie BJ. Problems in diagnosing scabies, a global disease in human and animal populations. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):268-279. [Crossref]
- Walton SF, Pizzutto S, Slender A, et al. Increased allergic immune response to sarcophages scabiei antigens in crusted versus ordinary scabies. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(9):1428-1438. [Crossref]
- Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, et al. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*. 2020;5(20):1-15. [Crossref]
- Akdis CA, Arkwright PD, Brüggemann MC, et al. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy*. 2020;75(7):1582-1605. [Crossref]
- Stephen B, Hajjar J. Overview of basic immunology and clinical application. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1244:1-36. [Crossref]
- Al-Musawi MM, Hasan HR, Maluki AH. Relationship between TH1, TH2 immune responses and serum SOD activity in scabies. *J Adv Biomed Pathobiol Res*. 2014;4(1):1-15.
- Martens PJ, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Vitamin D's effect on immune function. *Nutrients*. 2020;12(5):1248. [Crossref]
- Bishop EL, Ismailova A, Dimeloe S, Hewison M, White JH. Vitamin D and immune regulation: antibacterial, antiviral, anti-inflammatory. *JBMR Plus*. 2021;5(1):e10405. [Crossref]
- Karagöz Güral N. *Köpeklerde Bazı Paraziter Dermatolozlarda Serum 25 Hidroksi Vitamin D3 Düzeyinin Belirlenmesi*. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 2017.
- Dimri U, Sharma MC, Yamdagni A, Ranjan R, Zama MMS. Psoroptic mange infestation increases oxidative stress and decreases antioxidant status in sheep. *Vet Parasitol*. 2010;168(3-4):318-322. [Crossref]
- Gombart AF, Pierre A, Maggini S. A review of micronutrients and the immune system-working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*. 2020;12(1):236. [Crossref]
- Fthenakis GC, Papadopoulos E, Himonas C, Leontides L, Kritas S, Papatstsas J. Efficacy of moxidectin against sarcoptic mange and effects on milk yield of ewes and growth of lambs. *Vet Parasitol*. 2000;87(2-3):207-216. [Crossref]
- William MS, Margo JP, Alan Kocan A. *Parasitic diseases of wild mammals*. 1st edn., Iowa state university press, Ames, 2001.
- Hayran M, Hayran M. *Sağlık Araştırmaları İçin Temel İstatistik*. 2nd edn., Azim Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 2018.
- Bickhardt K, Ganter M, Sallmann P, Fuhrmann H. Investigations on manifestations of vitamin E and selenium deficiency in sheep and goats. *Dtsch Tierarztl Wschr*. 1999;106(6):242-247.
- Lewis ED, Meydani, SN, Wu D. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life*. 2019;71(4):487-494. [Crossref]
- Li-Weber M, Gaiasi M, Treiber MK, Krammer PH. Vitamin E inhibits IL-4 gene expression in peripheral blood T cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(9):2401-2408. [Crossref]
- Malmberg KJ, Lenkei R, Petersson M, et al. Short-term dietary supplementation of high doses of vitamin E increases T helper 1 cytokine production in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(6):1772-1778.
- Han SN, Wu D, Ha WK, et al. Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production in old mice infected with influenza virus. *Immunology*. 2000;100(4):487-493. [Crossref]
- Ural K, Tunca R, Ural DA, et al. Interpretation of serum 25-hydroxy vitamin D3 concentrations in sheep with naturally occurring sarcoptic mange. *J Adv Vet Bio Sci Tech*. 2018;3(1):35-40. [Crossref]
- Başbuğ O, Tuzcu N, Ercan N, Aydoğdu U, Oğrak YZ. Serum vitamin D levels in sheep with Caseous Lymphadenitis. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*. 2014;28(2):77-80.
- Hammouda MB, Ford AE, Liu Y, Zhang JY. The JNK signaling pathway in inflammatory skin disorders and cancer. *Cells*. 2020;9(4):857. [Crossref]

26. Singh SK, Dimri U, Sharma B, Saxena M, Kumari P. Assessment of the cytokine profile in peripheral blood mononuclear cells of naturally *Sarcoptes scabiei* var. *canis* infested dogs. *Vet Parasitol.* 2014;206(3-4):253-257. [\[Crossref\]](#)
27. Lalli PN, Morgan MS, Arlian LG. Skewed Th1/Th2 immune response to *Sarcoptes scabiei*. *J Parasitol.* 2004;90(4):711-714. [\[Crossref\]](#)
28. Mounsey KE, McCarthy JS, Walton SF. Scratching the itch: new tools to advance understanding of scabies. *Trends Parasitol.* 2013;29(1):35-42. [\[Crossref\]](#)
29. Walton SF, Beroukas D, Roberts-Thomson P, Currie BJ. New insights into disease pathogenesis in crusted (Norwegian) scabies: the skin immune response in crusted scabies. *Br J Dermatol.* 2008;158(6):1247-1255. [\[Crossref\]](#)
30. Roberts LJ, Huffam SE, Walton SF, Currie BJ. Crusted scabies: clinical and immunological findings in seventy-eight patients and a review of the literature. *J Infect.* 2005; 50(5):375-381. [\[Crossref\]](#)
31. Sarre C, Gonzalez-Hernandez A, Van Coppennolle S, et al. Comparative immune responses against *Psoroptes ovis* in two cattle breeds with different susceptibility to mange. *Vet Res.* 2015;46(1):1-10. [\[Crossref\]](#)
32. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Th1 and Th2 inducing cytokines in Cystic echinococcosis. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2005;29(3):167-170.
33. Maggi E. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology.* 1998;3(4):233-244. [\[Crossref\]](#)
34. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;125(2):73-80. [\[Crossref\]](#)
35. Bhat SA, Mounsey KE, Liu X, Walton SF. Host immune responses to the itch mite, *Sarcoptes scabiei*, in humans. *Parasites & Vectors.* 2017;10(1):1-12. [\[Crossref\]](#)
36. Van den Broek AH, Huntley JF, MacHell J, et al. Cutaneous and systemic responses during primary and challenge infestations of sheep with the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunol.* 2000; 22(8):407-414. [\[Crossref\]](#)
37. Guillot X, Semerano L, Saldenber-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Jt Bone Spine.* 2010;77(6):552-557. [\[Crossref\]](#)
38. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1, 25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(6):1717-1720. [\[Crossref\]](#)
39. Smolders J, Thewissen M, Peelen E, et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 2009;4(8):e6635. [\[Crossref\]](#)
40. Cantorna MT, Hullett DA, Redaelli C, Brandt CR, Humpal-Winter J, Sollinger HW, Hector D. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 prolongs graft survival without compromising host resistance to infection or bone mineral density. *Transplantation.* 1998;66(7):828-831. [\[Crossref\]](#)
41. Meckel K, Li YC, Lim J, Kocherginsky M, Weber C, Almoghrabi A, Cohen RD. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration is inversely associated with mucosal inflammation in patients with ulcerative colitis. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(1):113-120. [\[Crossref\]](#)
42. Jiao X, Wang L, Wei Z, Liu B, Liu X, Yu X. Vitamin D deficiency during pregnancy affects the function of Th1/Th2 cells and methylation of IFN- γ gene in offspring rats. *Immunol Lett.* 2019;212:98-105. [\[Crossref\]](#)

Türkiye’de Varroa Akarlarında Lake Sinai Virus (LSV)’ un İlk Tespiti

First Detection of Lake Sinai Virus (LSV) in Varroa Mites in Turkey

Abdurrahman Anıl
ÇAĞIRGAN 
Murat KAPLAN 
Kemal PEKMEZ 
Fatih ARSLAN 

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Viroloji Bölümü, İzmir, Türkiye

öz

Arı virusları koloni sağlığını olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerdendir. Virusların genellikle koloni kayıplarıyla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Koloni sağlığını etkileyen viruslardan olan LSV, bal arılarında ilk kez 2009 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’ nde keşfedilmiş henüz sınıflandırılmamış bir RNA virusudur. Patogenitesi henüz tam olarak bilinmemesine rağmen koloni sağlığını etkilediği bilinmektedir. Varroa akarları ise virusları bal arılarına hem biyolojik hem de mekanik olarak bulaştırarak koloni sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu çalışmada, arı viruslarının bal arılarına bulaşmasında vektör rolü oynayan Varroa akarlarında LSV genomunun RT-PCR ile moleküler olarak tespiti amaçlanmıştır. İzmir (n = 6) ve Muğla (n = 20) illerinde yer alan birbirinden farklı 26 arılıktan toplanan Varroa akarlarının 12’sinde LSV genomu pozitif olarak tespit edilmiştir. Muğla ilinden toplanan Varroa örneklerinin %50’si, İzmir ilinden toplanan örneklerin ise %33,3’ü LSV pozitifdir. Sonuç olarak, bu çalışmada LSV genomu ülkede ilk defa tespit edilmiş, Türkiye’de bulunan bal arılarının viral hastalıklarının bulaşmasında biyolojik veya mekanik vektörlük yapan Varroa akarları hakkındaki bilgileri genişletmeye çalışmıştır. LSV’nin Varroa akarları ile ilişkisini ve ülkedeki bal arılarının popülasyonları üzerindeki gerçek etkisini belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bal arısı, Lake Sinai Virus, Türkiye, Varroa akarı

ABSTRACT

Bee viruses are one of the most important agents that negatively affect colony health. It is known that viruses are generally associated with colony losses. LSV, one of the viruses that affect colony health, is an RNA virus that was first detected in honey bees in 2009 in the United States of America and has not yet been classified. Although its pathogenicity is not fully known yet, it is known to affect colony health. Varroa mites affect the health of the colony negatively by transmitting viruses to honey bees both biologically and mechanically. This study, it was aimed to molecularly detect the LSV genome by RT-PCR in Varroa mites, which play a vector role in the transmission of bee viruses to honey bees. LSV genome was positive in 12 of the Varroa mites collected from 26 different apiaries in İzmir (n = 6) and Muğla (n = 20). 50% of Varroa samples collected from Muğla province and 33.3% of samples collected from İzmir province were LSV positive. In conclusion, in this study, the LSV viral genome was detected for the first time in the country, and it tried to expand the knowledge about the diversity of viral diseases of honey bees in Turkey and Varroa mites, which play a biological or mechanical role in the transmission of viral diseases. Further studies are needed to determine the association of LSV with Varroa mites and the actual impact on honey bee populations in the country.

Keywords: Honey bee, Lake Sinai Virus, Turkey, Varroa mite

GİRİŞ

Lake Sinai Virus (LSV), Sinai virus genusu içerisinde sınıflandırılmış, henüz belli bir aileye ait olmayan kronik arı felci virusu (CBPV) ve sıklıkla balıklarda hastalıklara sebep olan Nodaviridae familyasında yer alan viruslar ile yakın ilişkilendirilmiş 5.6 kb uzunluğunda, pozitif polariteli bir RNA virusudur.^{1,2} LSV ilk kez 2009 yılında ABD’ nin Güney Dokata ayaletinde yer alan Sinai gölü etrafında ticari arıcıların koloni kayıplarının artması sonucu, LSV-1 ve LSV-2 olarak iki ayrı varyant olarak tespit edilmiştir.¹ Daha sonraki çalışmalarda, LSV 3-8 gibi farklı varyantların varlığı da bildirilmiştir.³⁻⁶ Patogenitesi ve semptomları henüz bilinmemesine rağmen, yüksek kayıpların görüldüğü kolonilerde az kayıpların görüldüğü kolonilere göre LSV viral yükünün daha fazla olduğu bilinmektedir.⁷

Lake Sinai Virus genomu, ORF1, RdRP ve kapsid dahil olmak üzere üç geni kodlamaktadır.⁸ Bunlardan, RNA’ya bağımlı RNA polimerazı kodlayan RdRP geni, farklı LSV suşlarında korunmuş bölge olarak bilinmektedir.⁴ Korunmuş bölge olmasından dolayı, farklı LSV varyantları için filogenetik dizi analizleri ve gruplandırma RdRP gen bölgesi hedef alınarak yapılmaktadır.^{6,9}

Virusların, özellikle deforme kanat virusunun (DWV), bal arılarına bulaşmalarında en önemli aktörlerden birisi Varroa akarlarıdır.¹⁰ Bu akar, gelişen pupa ve yetişkin arıların hemolenfi ile beslenir ve virus partiküllerini doğrudan arı hemolenfine enjekte ederek vektör görevi görür.¹¹ Varroa akarı ayrıca, konakçıda immünosupresyona neden olarak viral enfeksiyonları aktive eder ve dolaylı olarak arılarda virus replikasyonunu uyandır.¹² LSV’ nin Varroa akarlarında varlığı tespit



Geliş Tarihi/Received: 22.12.2021
Kabul Tarihi/Accepted: 08.03.2022

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:
Abdurrahman Anıl ÇAĞIRGAN
E-posta: a.anilcagirgan@gmail.com

Atır: Çağırın AA, Kaplan M, Pekmez K, Arslan F. Türkiye’de Varroa Akarlarında Lake Sinai Virus (LSV)’ un İlk Tespiti. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 16-19.

Cite this article: Çağırın AA, Kaplan M, Pekmez K, Arslan F. First detection of Lake Sinai Virus (LSV) in Varroa mites in Turkey. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 16-19.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

edilmesine rağmen Varroa ve bazı arı türlerinde replike olmadığı belirlenmiştir.^{4,13}

Türkiye’de arı sağlığını etkileyen viruslar daha önceki farklı çalışmalarda incelenmiş, koloni sağlığını olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Bugüne kadar ülkemizde yapılan çalışmalarda DWV, CBPV, SBV (sacbrood virus), BQCV (black queen cell virus) ve ABPV (acute bee paralysis virus) virusları kolonilerde sık olarak tespit edilen viruslardır.¹⁴⁻²⁰ LSV ile ilgili olarak ülkemizde yapılan mevcut tek bir çalışma bulunmaktadır.¹⁵ Bu yüzden ülkemiz adına LSV’ nin kolonilerdeki varlığı hakkında bilgilerimiz oldukça sınırlıdır.

Bu çalışma, Türkiye’de bal arısı popülasyonunun önemli bir bölümüne sahip Muğla ve İzmir illerinde yer alan arılıklarda/kolonilerde tespit edilen Varroa akarlarında LSV varlığının RT-PCR ile tespitini amaçlamıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma için, 15.02.2014 ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan ‘Hayvan Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik’in 4.1 madde (d) bendinde yer alan hükümlere göre Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayına gerek duyulmadığı bildirilmiştir. Bu onay, İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu’nun 16.12.2021 tarihli ve 770 sayılı kararınca alınmıştır.

Türkiye’nin batısında yer alan İzmir (n = 6) ve Muğla (n = 20) illerinden (Şekil 1), birbirlerinden farklı toplam 26 arılıktan Varroa akarları toplanmıştır. Örneklemeler 2020 yılının Nisan ve Haziran ayları arasında gerçekleşmiştir. Her arılıktan 20-100 arası Varroa toplanmış, üzerlerine 2 ml PBS buffer (Phosphate Buffered Saline) ilave edilerek, homojenizatör (Allsheng Bioprep-24R, Çin) yardımı ile ezilmiştir. Daha sonra homojenatlar 3500 rpm’de 4°C’de 30 dakika santrifüj edilmiş, süpernantantlar ayrılarak ekstraksiyona kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

RNA ekstraksiyonu için 200 µl süpernatant alındı. Ekstraksiyon işlemi, üretici firmanın talimatlarına göre High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) kullanılarak gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen RNA, test edilene kadar -20°C’de saklandı.

Tüm LSV varyantı için korunmuş ORF1 RdRp gen bölgesini hedefleyen, RNA’nın 603-bp’lik bir parçasını oluşturan primerler (LSV



Şekil 1. Ülkenin en önemli bal arısı popülasyonuna sahip İzmir ve Muğla illerinin coğrafik konumu

1765-F: 5’-TCA AYC TKG AGC GAT TTC GTG CTG-3’; LSV 2368-R: GAG GTG GCG CSA GAT AAA GT-3’) kullanılmıştır.⁴ Amplifikasyon için Xpert One-Step RT-PCR Kiti (Grisp Research Solutions, Porto, Portugal) kullanıldı. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl ve primerin nihai konsantrasyonu 0,4 mM idi.

PCR için Thermal cyclers koşulları sıralanan adımlar ve süreler ile oluşturulmuştur. İlk olarak, komplementer DNA sentezi için revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 95°C’de 3 dakika boyunca ilk denatürasyon yapıldı. Bu adımı 35 döngü olacak şekilde; 95°C’de 10 saniye denatürasyon, 60°C’de 10 saniye bağlanma ve 72°C’de 15 saniye uzama döngüleri izlemiştir. En son 72°C’de 1 dakika süreyle uzama olmuştur. Elde ettiğimiz PCR ürünleri, %1,5 agaroz jel elektroforezinde (etidyum bromür içeren) yürütüldü ve UV ışık kaynağı altında görüntülendi.

BULGULAR

LSV için toplam 26 adet farklı arılıktan toplanan Varroa akarları RT-PCR ile test edilmiştir. Yapılan testlerin sonucunda 12 arılıktan toplanan Varroa örnekleri LSV pozitif olarak tespit edilmiştir. İzmir’den toplanan örneklerden altı arılıktan ikisi pozitifken, Muğla örneklerinin ise 10’nu pozitif olarak tespit edilmiştir. Buna göre Muğla ilinden toplanan Varroa örneklerinin %50’si, İzmir ilinden toplanan örneklerin ise %33,3’ü LSV pozitifdir.

TARTIŞMA

Tarihsel ve evrimsel süreçte görülmüştür ki, memeli ya da eklem bacaklı birçok türü enfekte edebilecek viral ajanlar bulunmaktadır. Bunlar hayvanları, insanları ve hatta parazitleri dahi enfekte edebilmektedir.^{21,22} Bu viral ajanlar emerging yada re-emerging bir statü kazanıp sağlığı her zaman tehdit edebilmektedir. Ülkemizde ve dünyada bu ve benzer birçok hayvan ve çeşitli parazitler canlı enfekte eden virusların araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır.^{23,24} Lake Sinai virus özelinde birçok arı viral hastalığı da ülkemizde tespit edilmiştir.¹⁷ LSV’nin arı kolonilerinde varlığına dair ilk bulgular, 2009 yılında iki farklı varyantının (LSV 1 and LSV 2) ABD’de tespit edilmesiyle ortaya çıkmıştır.¹ Türkiye’de LSV’ nin ergin arılarda metagenomik çalışmalar sonucunda varlığı bildirilmiş¹⁵ fakat Varroa akarlarında varlığına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışma, dünyanın en fazla arı popülasyonuna sahip ülkelerinden biri konumunda olan Türkiye’de Varroa akarlarında LSV tespitinin yapıldığı ilk çalışmadır.

LSV bal arısı sağlığı için büyük bir tehdit olarak bilinmesine rağmen patojenitesi tam olarak anlayamamıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda elde edilen bulgular, LSV enfeksiyonu ile koloni çöküş bozukluğu (Colony Collapse Disorder-CCD) oluşumu arasında doğrudan bir korrelasyon olduğunu göstermektedir.⁷ Daha önceki çalışmalarda, LSV’ nin bal arılarına bulaşmasında vertikal ve gıda kaynaklı bulaşmanın önemini belirtilmiştir. Varroa akarlarının ise etkenin bulaşmasında biyolojik vektörlük yapmadığı tespit edilmiş fakat bulaşmadaki rolü net olarak ortaya koyulamamıştır. Ancak bu çalışmada olduğu gibi bazı araştırmalarda da virusun akarlarda varlığının gösterilmesi, LSV’nin en azından Varroa akarları tarafından konaklar arasında mekanik olarak aktarılabilirliğini düşündürmektedir.⁴ Daha önce ülkenin beş bölgesini içeren ve önemli arı popülasyonunu barındıran ve Ege Bölgesi’ni de kapsayan bir çalışmada Varroa enfestasyonunun %41 olduğu düşünüldüğünde²⁵ mekanik vektörlük altı çizilmesi gereken bir konu olarak ortaya çıkmaktadır.

LSV Türkiye kolonilerinde Tozkar ve ark.¹⁵ belirttiği gibi oldukça yaygındır. Daha önceki çalışmalar, LSV’nin yüksek prevalansı ve global

dağılımını göstermiştir.^{1,5,9,26,27} Çalışmamızda 26 farklı arılıktan topladığımız Varroa akarlarının %46.1'inde LSV RNA'sı tespit edilmiştir. Ravoet ve ark.⁴ polen ve Varroa akarlarında LSV'nin varlığını göstermiş, ancak virusun Varroa akarlarında replike olmadığını belirtmişlerdir. Bazı arılıkların yetişkin arılarında LSV enfeksiyonunun tanımlanması ve aynı arılıkların Varroa akarlarında varlığının olmaması, virusun bal arısı popülasyonlarında artropod-vektörler dışındaki bulaşma yollarının daha önemli olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma LSV genomu ülkede ilk defa tespit edilmiştir. Ayrıca, Türkiye'de bulunan bal arılarının viral hastalıklarının çeşitliliği ve viral hastalıkların bulaşmasında biyolojik veya mekanik olarak rol üstlenen Varroa akarları hakkındaki bilgileri genişletmeye çalışmıştır. Tespit edilen bu yeni viral etkenlerle ilgili yeni soruları gündeme getirmiştir. Yılda en az iki mevsimi kapsayan ve farklı ekotiplerle farklı bal arısı popülasyonlarını karşılaştıran, daha fazla sayıda numuneyi ve daha fazla bölgeyi kapsayan gelecekte yapılacak daha ayrıntılı çalışmalar, viral dinamikleri ve epidemiyolojiyi açıklayabilmek için gereklidir. LSV'nin Varroa akarları ile ilişkisini ve ülkedeki bal arılarının popülasyonları üzerindeki gerçek etkisini belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Etik Komite Onayı: Çalışma için, 15.02.2014 ve 28914 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan 'Hayvan Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik'in 4.1 madde (d) bendinde yer alan hükümlere göre Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayına gerek duyulmadığı bildirilmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – A.A.Ç.; Tasarım – A.A.Ç., M.K., K.P.; Denetleme – S.A.A.Ç., M.K., K.P.; Kaynaklar – A.A.Ç., M.K., K.P., F.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – A.A.Ç., M.K., K.P., F.A.; Analiz ve/veya Yorum – A.A.Ç., M.K., K.P., F.A.; Literatür Taraması – A.A.Ç.; Yazıyı Yazan – A.A.Ç.; Eleştirel İnceleme – M.K., K.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: It was reported that the approval of the local animal experimentation ethics committee was not required for the study, according to the provisions of section 4.1 (d) of the "Regulation on the Working Procedures and Principles of Animal Committees" published in the Official Gazette No. 28914 and on 15/02/2014. This authorization was granted by the Decision of the Ethics Committee for Experimental Animals of İzmir/Bornova Veterinary Control Institute dated 16.12.2021, number 770.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – A.A.Ç.; Design – A.A.Ç., M.K., K.P.; Supervision – A.A.Ç., M.K., K.P.; Resources – A.A.Ç., M.K., K.P., F.A.; Data Collection and/or Processing – A.A.Ç., M.K., K.P., F.A.; Analysis and/or Interpretation – A.A.Ç., M.K., K.P., F.A.; Literature Search – A.A.Ç.; Writing Manuscript – A.A.Ç.; Critical Review – M.K., K.P.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR



1. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, et al. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal

- prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS One*. 2011;6(6):e20656. [Crossref]
2. Grozinger CM, Flenniken ML. Bee viruses: Ecology, pathogenicity, and impacts. *Annu Rev Entomol*. 2019;64:205-226. [Crossref]
3. Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerrero C, et al. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai Viruses. *PLoS One*. 2013;8(2):e57459. [Crossref]
4. Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, de Graaf DC. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Res*. 2015;201:67-72. [Crossref]
5. Roberts JM, Anderson DL, Durr PA. Absence of Deformed wing virus and Varroa destructor in Australia provides unique perspectives on honey bee viral landscapes and colony losses. *Sci Rep*. 2017;7(1):6925. [Crossref]
6. Şimenc L, Kuhar U, Jamnikar-Ciglencič U, Toplak I. First complete genome of Lake Sinai Virus Lineage 3 and genetic diversity of Lake Sinai Virus strains from honey bees and Bumble bees. *J Econ Entomol*. 2020;113(3):1055-1061. [Crossref]
7. Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, et al. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One*. 2012;7(8):e43562. [Crossref]
8. Bigot D, Dalmon A, Roy B, et al. The discovery of Halictivirus resolves the Sinaivirus phylogeny. *J Gen Virol*. 2017;98(11):2864-2875. [Crossref]
9. Shojaei A, Nourian A, Khanjani M, Mahmoodi P. The first molecular characterization of Lake Sinai virus in honey bees (*Apis mellifera*) and Varroa destructor mites in Iran. *J Apic Res*. 2021;doi:10.1080/00218839.2021.1921467 [Crossref]
10. Martin SJ, Highfield AC, Brettell LE, et al. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*. 2012;336(6086):1304-1306. [Crossref]
11. Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni Oud. *J Invertebr Pathol*. 1999;73(1):101-106. [Crossref]
12. Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(21):7470-7475. [Crossref]
13. Daughenbaugh KF, Martin M, Brutscher LM, et al. Honey bee infecting Lake Sinai viruses. *Viruses*. 2015;7(6):3285-3309. [Crossref]
14. Gümüşova O, Albayrak H, Kurt M, Yazıcı Z. Prevalence of three honey bee viruses in Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 2010;80(6):779-785.
15. Tozkar CÖ, Kence M, Kence A, Huang Q, Evans JD. Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies. *Front Genet*. 2015;6:100. [Crossref]
16. Kalaycı G, Cagırgan AA, Kaplan M, et al. The role of viral and parasitic pathogens affected by colony losses in Turkish apiaries. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2020;26(5):671-677.
17. Cagırgan AA, Yazıcı Z. The prevalence of seven crucial honeybee viruses using multiplex RT-PCR and their phylogenetic analysis. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2021;45(1):44-55. [Crossref]
18. Karapınar Z, Oğuz B, Dinçer E, Öztürk C. Phylogenetic analysis of black queen cell virus and deformed wing virus in honeybee colonies infected by mites in Van, Eastern Turkey. *Med Weter*. 2018;74(7):460-465. [Crossref]
19. Oğuz B, Karapınar Z, Dinçer E, Değer MS. Molecular detection of nosema spp. and black queen-cell virus in honeybees in Van province, Turkey. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2017;41(2):221-227. [Crossref]
20. Muz D, Muz MN. A molecular epidemiological study of black queen cell virus in honeybees (*Apis mellifera*) of Turkey: the first genetic characterization and phylogenetic analysis of field viruses. *Apidologie*. 2017;49(4):1-12. [Crossref]
21. Berber E, Şimşek E, Çanakoğlu N, Sürsal N, Gençay GA. Newly identified Cryptosporidium parvum virus-1 from newborn calf diarrhoea in Turkey. *Transbound Emerg Dis*. 2020;68(4):2571-2580. [Crossref]

22. Aktaş O, Aydın H, Timurkan MO. A molecular study on the prevalence and coinfections of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in children with gastroenteritis. *Minerva Pediatrica*. 2019;71(5):431-437. [\[Crossref\]](#)
23. Oğuzoğlu TÇ, Timurkan MÖ, Muz D, et al. First molecular characterization of feline immunodeficiency virus in Turkey. *Arch Virol*. 2010;155(11):1877-1881. [\[Crossref\]](#)
24. Timurkan MO, Aydın H. Cirit atlarında İnfluenza A Virus enfeksiyonunun serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*. 2019;14(1):71-77. [\[Crossref\]](#)
25. Cakmak I, Aydın L, Gulegen E, Wells H. Varroa (Varroa destructor) tracheal mite (Acarapis woodi) incidence in the Republic of Turkey. *J Apic Res*. 2003;42(4):57-60. [\[Crossref\]](#)
26. Brasesco C, de Landa GF, Quintana S, et al. A Lake Sinai Virus variant is infecting managed honey bee colonies of Argentina with varying degrees of Varroa destructor infestation. *Bee World*. 2021;1:1-6. [\[Crossref\]](#)
27. Remnant EJ, Shi M, Buchmann G, et al. A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *J Virol*. 2017;91(16):e00158-17. [\[Crossref\]](#)

Determination of the Content of Bone Inclusions in Multicomponent Meat Products

Çok Bileşenli Et Ürünlerinde Kemik Kalıntı İçeriğinin Belirlenmesi

Nina USATENKO¹ 
Sergii VERBYTSKYI² 

¹Department of Professional Education (Food Technologies), Pereiaslav-Khmelnytskyi Hryhoriy Skovoroda State Pedagogical University, Pereiaslav, Ukraine

²Department of Informational Support, Standardization and Metrology, Institute of Food Resources of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ABSTRACT

A specific criterion for the use of mechanically deboned poultry meat in sausages and other meat products is the presence of bone inclusions. Known methods for determining bone inclusions in mechanically deboned meat do not provide the required accuracy for meat products as they contain spices, starch, dietary fiber, and other ingredients. These methods are too complicated and expensive. The purpose of this study is to develop a simple and accurate method for the gravimetric determination of bone inclusions in meat products. To reach the purpose the known methods of quantitative analysis of bone inclusions in meat products and the repeatability and reproducibility of the said methods were improved. The results of the research consist in the developed gravimetric method for determining bone inclusions in meat products and its metrological acceptance duly proven. Samples of meat products are treated with 2% alkali solution (KOH) for complete dissolution of proteins and fat. The samples are then treated with a concentrated solution of zinc chloride (ZnCl₂). This reagent suspends food moisture retaining additives, such as starch and fibers. As a result, their density is higher than that of spices, but lower than that of bone inclusions. When the resulting suspension is allowed to stand, the spices float to the surface, and the bone inclusions precipitate. The precipitate is washed, dried, and the mass of bone inclusions is determined. Experiments showed that the relative total error in measurements of bone inclusions increases with a decrease in their content in meat products and does not exceed 45% for the official norms of Ukraine ranging from 0.1% to 0.2% of bone inclusions. The conclusion can be drawn that the method for determining the mass fraction of bone inclusions in multicomponent meat products, developed and approved at the official level for analytical practice, expands the possibility of determining the degree of falsification of these products at the level of qualitative and quantitative expertise in accordance with the normative documents in force.

Keywords: Bone inclusions, chemical reagent, gravimetric analysis, mechanically deboned poultry meat

Öz

Sosislerde ve diğer et ürünlerinde mekanik olarak kemiği çıkarılmış kanatlı etinin kullanımı için özel bir kriter, kemik kalıntılarının varlığıdır. Mekanik olarak kemiği çıkarılmış ette kemik kalıntılarını belirlemek için bilinen yöntemler, baharat, nişasta, diyet lifi ve diğer bileşenleri içerdiklerinden et ürünleri için gerekli doğruluğu sağlamak ve bu yöntemler çok karmaşık ve pahalıdır. Bu çalışmanın amacı, et ürünlerindeki kemik kapaçlarının gravimetrik tayini için basit ve doğru bir yöntem geliştirmektir. Amaca ulaşmak için et ürünlerindeki kemik kapaçlarının bilinen kantitatif analiz yöntemleri ve söz konusu yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği geliştirildi. Araştırmanın sonuçları, et ürünlerinde kemik kapaçlarını belirlemek için geliştirilmiş gravimetrik yöntem ve bunun metrolojik kabulü usulüne uygun olarak kanıtlanmıştır. Et ürünleri örnekleri, proteinlerin ve yağın tamamen çözünmesi için %2 alkali solüsyon (KOH) ile işlenir. Numuneler daha sonra konsantre bir çinko klorür (ZnCl₂) çözeltisi ile işlendi. Bu reaktif, nişasta ve lifler gibi gıda nemi tutucu katkı maddelerini askıya alınır. Sonuç olarak, yoğunlukları baharatlardan daha yüksek, ancak kemik kapaçlarından daha düşüktür. Ortaya çıkan süspansiyonun beklemesine izin verildiğinde, baharatlar yüze çıkar ve kemik kalıntıları çöker. Çökelti yıkanır, kurutulur ve kemik kapaçlarının kütlesi belirlendi. Deneyler, kemik kapaçlarının ölçümlerindeki nispi toplam hatanın et ürünlerindeki içeriklerinde bir azalma ile arttığını ve Ukrayna'nın resmi normları için kemik kapaçlarının %0,1 ila %0,2'si için %45'i geçmediğini gösterdi. Analitik uygulama için resmi düzeyde geliştirilen ve onaylanan çok bileşenli et ürünlerinde kemik kapaçlarının kütle fraksiyonunu belirleme yönteminin, bu ürünlerin tahrif derecesini niteliksel düzeyde belirleme olasılığını genişlettiği sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Kemik kalıntıları, kimyasal reaktif, gravimetrik analiz, mekanik olarak kemiği çıkarılmış kanatlı eti

INTRODUCTION

Globally, multiple methods for analyzing bone inclusions in meat mechanically separated from bones (chemical, biochemical, and others) are used¹⁻⁶, which do not cover the field of application

with such a complex multicomponent system as meat products. Literature data on a number of the claimed methods (classical and innovative)⁷⁻¹² used for this purpose are limited and inaccessible for a number of laboratories; therefore, the said publications were not taken for discussion here-



Received/Geliş Tarihi: 16.08.2021

Accepted/Kabul Tarihi: 21.03.2022

Corresponding Author/Sorumlu Yazar:
Sergii VERBYTSKYI
E-mail: tk140@hotmail.com

Cite this article: Usatenko N, Verbytskyi S. Determination of the content of bone inclusions in multicomponent meat products. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 20-25.

Atif: Usatenko N, Verbytskyi S. Çok Bileşenli Et Ürünlerinde Kemik Kalıntı İçeriğinin Belirlenmesi. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 20-25.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

after. However, on the basis of our own research results regarding the direct application of the classical method for determining the mass fraction of bone inclusions in mechanically deboned meat¹ found that this method does not provide the required measurement accuracy.¹³ The quantitative analysis of these inclusions in multicomponent meat products (sausages, canned foods, convenience foods), which are often falsified by the unauthorized replacement of expensive raw meats of hand deboning with cheap mechanically deboned meat was not accurate. Yet, considering the availability and simplicity of its implementation, as well as the importance of and urgency in identifying falsification of meat products, it was decided to conduct a set of theoretical and experimental studies aimed at improving the gravimetric sedimentation method with the aim of using it to analyze bone inclusions in multicomponent meat products. Therefore, we believe our study can have important regulatory and legal significance for protecting the interests of consumers of meat products in addition to scientific and practical applications.

MATERIAL AND METHODS

Considering the multifactorial nature of the research, in the context of the general experimental plan, a certain sequence of implementation of its main stages was envisaged: conducting research to clarify the significant physical and chemical characteristics of the food ingredients and chemical reagents involved in the research → production of control and prototypes of meat products according to an individual recipe → separation of fine mincing samples → treatment of each sample with an alkaline solution → sedimentation and decantation of the resulting solutions → treatment of sediments with a chemical reagent that dissolves starch and fibers, having a specific gravity less than the specific gravity of the bone residue and greater than that of spices → settling solutions → decantation of the resulting suspensions → drying the precipitate to constant weight and calculation of the content of bone inclusions in each sample.

Methods

Isolation of bone inclusions from mechanically deboned poultry meat and determination of their mass was carried out according to¹

To improve the test integrity, the main chemical reagents for research were prepared manually as below:

- To prepare a solution of potassium hydroxide with a mass fraction of 2%, a weighed portion of potassium hydroxide weighing (20.0 ± 0.5) g was dissolved in 980 cm³ of distilled water, cooled, and stored in a closed glass or polyethylene container. Shelf-life of potassium hydroxide solution at room temperature is no more than 60 days.
- The preparation of a concentrated solution of zinc chloride (ZnCl₂) was carried out as follows: a sample of ZnCl₂ of 280.0 g to 300.0 g (depending on its water content) was dissolved in 100.0 cm³ of distilled water, with continuous cooling of the dishes under cold running water. The solution was allowed to stand for a day (a saturated solution is characterized by the presence of a precipitate of undissolved ZnCl₂) and decanted. The decant was diluted with distilled water sequentially as follows: first, a saturated solution of ZnCl₂ was poured into a measuring cylinder, then a hydrometer of the appropriate measurement range was placed there; and with continuous stirring and gradually adding distilled water, the solution was brought to a concentration γ_p from 1.65 g/cm³ to 1.8 g/cm³. The resulting solution was filtered through funnels for

filtering – glass porous filters POR160 or POR250, or through gauze folded four times. The finished filtered concentrated solution was stored at room temperature in a closed glass container for no more than 90 days.

The determination of the mass fraction of bone inclusions in meat products was carried out in the following sequence: a portion of each of the samples of meat products weighing 50 g was placed in a beaker of volume 250 cm³, then 100 cm³ of a 2% KOH solution was added, thoroughly mixed, and heated in a water bath to a temperature of about 100 °C repeating the procedure multiple times, until the muscle, connective, and fat fractions were completely dissolved. The decant was removed, and the resulting amorphous gelatinous precipitate, washed with distilled water, was treated with a concentrated solution of ZnCl₂, stirring continuously, to dissolve starch and/or fiber and to separate the dispersed phase: spices (the light fraction floated to the surface of the ZnCl₂ solution, whereas heavier bone inclusions precipitated). After washing with distilled water (until the ZnCl₂ solution was completely removed), the bone residue was filtered through a paper filter, dried to constant weight, weighed, and the mass fraction of bone inclusions calculated.

Measurements of the weights of the samples were carried out using a balance AXIS AD 50 with a measurement error of 0.001 g.

The concentration of solutions was determined using a general-purpose hydrometer AON-1, length 170.0 mm, diameter 20.0 mm, error ± 1.0 kg/m³, measurement range from 1.60 g/cm³ to 1.66 g/cm³; from 1.66 g/cm³ to 1.72 g/cm³; from 1.72 g/cm³ to 1.78 g/cm³; and from 1.78 g/cm³ to 1.84 g/cm³.

Calculations of the metrological characteristics of the method for analyzing bone inclusions in multicomponent meat products were carried out according to DSTU-N RMG 61:2006¹⁴ using a specially created software. The evaluation factors for the correctness of the analysis method were:

Qualitative characteristics of the analysis method - accuracy, correctness, and precision (repeatability and reproducibility) of the analysis

Quantitative characteristics of the analysis method - indicators of accuracy, correctness, and precision (repeatability and reproducibility) of the analysis.

The experiments were carried out under the following conditions: room air temperature 20°C \pm 5°C, atmospheric pressure 84.0–106.7 kPa, relative air humidity 30.0%–80.0%; AC frequency 50 Hz \pm 1 Hz; voltage in the electrical network 220 V \pm 10 V.

The procedure for reproducibility determination of indicators of accuracy, correctness, and precision of measurements was carried out in 5 laboratories of Ukraine, duly accredited for technical competence and independence.

Materials

Based on the analysis of the data set forth in^{15,16}, in the industry standard of Ukraine¹⁷, in the US Code of Federal Regulations¹⁸, as well as on the results of research¹⁹; a limitation of the range of measurements of the mass fraction of bone inclusions in meat products was substantiated when carrying out experiments in the range of 0.02%–1.5%. The correctness of the decision is confirmed by the fact that the above range covers the limitation of the content of bone inclusions in sausages, depending on their grade, in the range of 0.1%–0.2%, provided for by the National Standards of Ukraine.^{20,21} To improve the measurement accuracy and estimate

the boundaries of possible errors in this case, the total measurement range was divided into a number of smaller ranges.

According to an individual formulation, 92 samples of meat products were taken from the same batch of hand deboned finely chopped meat. The said samples differed in their formulations (Figure 1). The order of performing technological operations is set out in Figure 1.

The program for calculating measurement errors provided for 2 parallel options:

- processing of the results of measurements of bone inclusions in samples of meat products containing only bone inclusions (Series 1 – control);
- processing of the results of measurements of bone inclusions in samples of meat products containing spices (Series 2), spices and starch (Series 3), and spices and fibers (Series 4) along with bone inclusions.

Statistical Analysis

The study was replicated three times and statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2010 and Statistica-6.0 software. Means and standard deviations were calculated. In parallel, a Student test was performed to identify differences between the average values of the test parameters. The differences between the values of the said parameters were found to be reliable if the probability value was greater or equal to 95% ($P \leq .5$). Metrological characteristics of the method for analyzing bone inclusions in multicomponent meat products were carried out according to DSTU-N RMG 61:2006¹⁴ using specially designed software. The evaluation factors for the accuracy of the analysis method were

characteristics of the analysis method - trueness and precision (repeatability and reproducibility).

RESULTS

According to the experimental plan, significant physical and chemical characteristics of the ingredients used in research as bone inclusions and spices were analytically and experimentally determined, as well as the effectiveness of the chemical reagents used was established:

- The range of changes in the specific gravity (γ_b) of bone inclusions isolated from the meat of mechanical deboning of carcasses and/or parts of carcasses of broilers $1.75 \text{ g/cm}^3 \leq \gamma_b \leq 2.0 \text{ g/cm}^3$
- The range of variation in the specific gravity (γ_{sp}) of spices used in the technology of meat products $0.5 \text{ g/cm}^3 \leq \gamma_{sp} \leq 0.62 \text{ g/cm}^3$
- One of the safest and most effective chemical reagents dissolving starch and fiber is a concentrated solution of ZnCl_2 , the concentration of which determined its specific gravity in the range of $1.62 \text{ g/cm}^3 \leq (\gamma) \leq 1.7 \text{ g/cm}^3$, which is more than the specific gravity of spices, but less than that of the bone residue
- For a more complete dissolution of protein and fat in samples of meat products, it is advisable to use a solution KOH with a concentration of 2%.

It was also determined that approximately 70 cm^3 of a concentrated solution of ZnCl_2 is consumed per 1 parallel portion of the analyzed sample.

The results of comparative measurements obtained in each of 5 participating independent laboratories under all conditions stipulated by the developed gravimetric analysis of bone inclusions in samples of meat products of similar composition and identical measurement ranges were in agreement with each other at a fairly acceptable level – the discrepancy between the accuracy indicators was no more than 0.2%.¹⁹

The averaged results of the carried out intra- and interlaboratory measurements and calculations of metrological indicators within the boundaries of each accepted range at a confidence level of $P = .95$ are presented in Table 1.

For admission of the method for measuring the mass fraction of bone inclusions in multicomponent meat products to analytical practice, in accordance with the requirements of GOST 8.010-99²², procedures were carried out to generalize, systematize, and mathematically process the corresponding metrological indicators presented in Table 1.

As a result of this work, the metrological characteristics of this method were obtained depending on the measurement range at a confidence level of $P = .95$, set forth in²³ and presented in Table 2.

From the analysis of the data given in Table 2, it follows that the relative total error in measurements of bone inclusions increases with a decrease in their content in meat products and does not exceed 45% for conditions that in Ukraine provide for limiting their content in these products within 0.1% up to 0.2%.^{20,21}

The measurement results served as the basis for certification and official admission of this gravimetric method to analytical practice, which makes it possible to separate bone inclusions from accompanying impurities and fairly reliably measure the mass fraction of bone inclusions in multicomponent meat products.²⁴

Adding ingredients to the chopped meat samples 1 – 4, % by mass			
Sample 1: - salt – 0 - spices – 0	Sample 2: - salt – 2.0 - spices – 0.2	Sample 3: - salt – 2.0 - spices – 0.2 - starch – 1.0	Sample 4: - salt – 2.0 - spices – 0.2 - fibers – 1.0
Partition of the samples 1–4 into 23 sub-samples 1-1 to 4-23, each of them being added a specified quantity of bone inclusions, % by mass:			
1	2	3	4
1-1	2-1	3-1	4-1
1-2	2-2	3-2	4-2
1-3	2-3	3-3	4-3
1-4	2-4	3-4	4-4
1-5	2-5	3-5	4-5
1-6	2-6	3-6	4-6
1-7	2-7	3-7	4-7
1-8	2-8	3-8	4-8
1-9	2-9	3-9	4-9
1-10	2-10	3-10	4-10
1-11	2-11	3-11	4-11
1-12	2-12	3-12	4-12
1-13	2-13	3-13	4-13
1-14	2-14	3-14	4-14
1-15	2-15	3-15	4-15
1-16	2-16	3-16	4-16
1-17	2-17	3-17	4-17
1-18	2-18	3-18	4-18
1-19	2-19	3-19	4-19
1-20	2-20	3-20	4-20
1-21	2-21	3-21	4-21
1-22	2-22	3-22	4-22
1-23	2-23	3-23	4-23

Figure 1. The procedure for performing technological operations when manufacturing the samples of meat products.

Table 1. The results of evaluating the metrological indicators of measuring the content of bone inclusions in samples of meat products depending on the measurement range at a confidence level of $P = .95$.

Ranges with limit values mass fraction of bone inclusions, %	Metrological indices, %					Accuracy index, $\pm \Delta m$ Samples 1 (control) and 2
	Repeatability index as standard deviation, σ_{rm}	Repeatability limit, r_{mM}	Reproducibility index as standard deviation, σ_{Rm}	Reproducibility limit, R_m	Correctness index, $\pm \Delta_{cm}$	
$(0.02 \leq X \leq 0.05)$	0.0026	0.0087	0.0020	0.0055	0.0246	0.025
$(0.05 \leq X \leq 0.1)$	0.0045	0.0150	0.0039	0.0109	0.0557	0.056
$(0.1 \leq X \leq 0.15)$	0.0046	0.0153	0.0040	0.0111	0.0885	0.089
$(0.15 \leq X \leq 0.2)$	0.0042	0.0139	0.0141	0.0390	0.1028	0.106
$(0.2 \leq X \leq 0.3)$	0.0167	0.0551	0.0260	0.0721	0.1236	0.134
$(0.3 \leq X \leq 0.6)$	0.0072	0.0237	0.0066	0.0182	0.1578	0.264
$(0.6 \leq X \leq 1.5)$	0.0104	0.0344	0.0143	0.0395	0.2629	0.251
Samples 3 and 4						
$(0.02 \leq X \leq 0.05)$	0.0053	0.0175	0.0042	0.0117	0.0251	0.026
$(0.05 \leq X \leq 0.1)$	0.0067	0.0222	0.0088	0.0243	0.0564	0.059
$(0.1 \leq X \leq 0.15)$	0.0084	0.0279	0.0136	0.0377	0.0900	0.094
$(0.15 \leq X \leq 0.2)$	0.0132	0.0436	0.0150	0.0415	0.1027	0.107
$(0.2 \leq X \leq 0.3)$	0.0080	0.0265	0.0353	0.0976	0.1272	0.145
$(0.3 \leq X \leq 0.6)$	0.0101	0.0333	0.0465	0.1289	0.1539	0.179
$(0.6 \leq X \leq 1.5)$	0.0325	0.1075	0.0762	0.2111	0.2825	0.320

Table 2. Metrological characteristics of the method for measuring bone inclusions in meat products depending on the measurement range at a confidence level of $P = .95$.

Mass fraction of bone inclusions: measurement range, %	Limit of the relative total error, $\pm \delta$, % ($P = .95$)	Operative control criteria:		
		repeatability r , % ($P = .95$; $n = 2$)	reproducibility, R , % ($P = .95$; $n = 2$)	accuracy, K , % ($P = .95$)
From 0.05 to 0.30 inclusive	45	18	23	45
Over 0.30 to 1.0 inclusive	30	12	15	30
Over 1.0 to 1.5 inclusive	24	10	12	24

DISCUSSION

On the basis of results of this study, we believe that the gravimetric method for determining the mass fraction of bone inclusions in multicomponent meat products developed by us is quite accurate, simple, and accessible for use by a wide range of research laboratories with various levels of equipment. Such an estimate is substantiated not only in the works of the authors of this article^{5,19,23,25}; but also the works of other authors published in different years describe the use of a fairly common chemical method with the determination of calcium (Ca^{2+}) ions, which showed sufficient accuracy.^{3,12,26,27} However, this method is associated with the need to use atomic absorption spectroscopy, which limits its implementation in practical conditions.^{26,27} In²⁶, there are concerns about the limited use of the chemical method with the determination of Ca^{2+} ions in relation to meat products with dairy ingredients in the formulations (powdered milk, whey, etc.), which are rich sources of calcium. These concerns are justified as dairy ingredients are used in dietary meat products^{28,29}; however, for cheap mince products containing mechanically deboned meat, the use of dairy ingredients is not typical.

In general, the error of the known indirect method for the quantitative analysis of bone inclusions in meat products by the content of Ca in them¹² is primarily owing to the quality of the meat desinewing, that is, it directly depends on the content of connective tissue in the meat. In addition, based on the results of studies¹ of the relationship “Ca content - content of bone inclusions,” in the mechanically deboned meat by plasma atomic absorption spectrometry and confirmed by gravimetric analysis of bone inclu-

sions, significant differences were revealed between the obtained conversion formula for these components and the conversion formula given in the method used by the International Association of Official Analytical Chemists AOAC 983.19.³⁰ The result of comparative calculations using these formulae for the mass fraction of bone inclusions at the same Ca content was 2 times less than that of.¹ The same researchers found that in the range of Ca content in mechanically deboned meat from 0.2% to 0.4%, the relative error in determining Ca by plasma atomic absorption spectrometry is 28%–29%. Hypothetically, the measurement error in the mass fraction of bone inclusions in meat products by this method can increase because of their complex composition. Thus, caution is required in both the accuracy of the quantitative analysis of bone inclusions in meat products using the “Ca content - bone inclusion content” relationship and the norms of bone inclusions content in official documents.^{5,19}

Another known and well-established histological method for the quantitative calculation of bone inclusions in a mince product is based on a detailed study of histological preparations and morphometric analysis of the bones. This method, although using an image analysis system, is a time-consuming and complex process; and identifying and accurately determining the boundaries of the measured bone particles is practically impossible without manual correction of the computer actions by a highly experienced histologist.^{2,26,31-33} Researchers¹⁰ have shown that the accuracy of measuring the amount of ingredients in meat products using this method is negatively affected by the nonlinear correlation between the volumetric and mass content data of various inclusions.

We are fully aware of the possibility and expediency of using other, high-tech methods for determining the content of mechanically deboned meat in meat products under laboratory conditions. In particular, the constant technical improvement of the production of this type of meat raw materials already often limits the use of traditional methods for determining the quality parameters of meat products.^{26,34} High-tech methods for determining the content of mechanically deboned meat in meat products include methods based on irradiation coupled with electronic spin resonance^{35,36} and the evaluation of radiostromium levels³⁷, laser-induced breakdown spectroscopy³⁸, X-ray application⁴⁷, Raman spectroscopy^{39,40}, innovative ultrasound method⁴¹, computed tomography²⁶, and so on. In connection with the rapid development of food science and the corresponding innovative technologies of meat products, it is possible to foresee the introduction of novelty formulations using mechanically deboned meat, control of which requires both new instrumental methods and traditional methods, in particular the improved gravimetric method proposed by us for determining bone inclusions in meat products.

In conclusion, from the analysis of the data obtained, it follows that the method for determining the mass fraction of bone inclusions in multicomponent meat products, developed and approved at the official level for analytical practice, deserves attention as it expands the possibility of determining the degree of falsification of these products at the level of qualitative and quantitative expertise in accordance with the requirements normative documentation and legislation of Ukraine.⁴²

Ethics Committee Approval: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – N.U.; Design – N.U., S.V.; Supervision – N.U., S.V.; Resources – N.U.; Data Collection and/or Processing – N.U.; Analysis and/or Interpretation – N.U., S.V.; Literature Search –S.V.; Writing Manuscript – N.U., S.V.; Critical Review – S.V.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: N/A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – N.U.; Tasarım – N.U., S.V.; Denetleme – N.U., S.V.; Kaynaklar – N.U.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – N.U.; Analiz ve/veya Yorum – N.U., S.V.; Literatür Taraması – S.V.; Yazıyı Yazan – N.U., S.V.; Eleştirel İnceleme – S.V.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.





REFERENCES

1. Krasnyukov YN, Gromov IY, Savinkova IP, Pavlenko NM, Danshova LL. Determination of bone inclusions and calcium in poultry meat of mechanical deboning. *Meat Technologies*. 2007;9:22-24.
2. Branschewitz W, Judas M, Höreth RH. The morphological detection of bone and cartilage particles in mechanically separated meat. *Meat Science*. 2009;81(1):46-50. [\[Crossref\]](#)
3. Mello MA, Neto JM, Torres EA. Application of multivariate analysis to the study of mechanically deboned chicken meat (MDCM). *Int Food Res J*. 2017;24(3):1102.
4. Dalipi R, Berneri R, Curatolo M, Borgese L, Depero LE, Sangiorgi E. Total reflection X-ray fluorescence used to distinguish mechanically separated from non-mechanically separated meat. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2018;148:16-22. [\[Crossref\]](#)
5. Usatenko NF, Kalashnik MG, Verbytskyi SB, Oxrimenko YI. Non-standardized raw material for the meat industry. *Food Industry: Science and Technologies*. 2021;4(54):34-40.
6. Wubshet SG, Wold JP, Böcker U, Sanden KW, Afseth NK. Raman spectroscopy for quantification of residual calcium and total ash in mechanically deboned chicken meat. *Food Control*. 2019;95:267-73. [\[Crossref\]](#)
7. Pospiech M, Zikmund T, Javůrková Z, Kaiser J, Tremlová B. An Innovative Detection of Mechanically Separated Meat in Meat Products. *Food Analytical Methods*. 2019;12(3):652-657. [\[Crossref\]](#)
8. Mokhtar D, Abdel-Aziz D, Youssef H, Taha A. Applied histological and chemical analysis for detection of adulteration of minced meat and sausage. *J Adv Micr Res*. 2018;13:1-9.
9. Khvylyia SI, Pchelkina VA, Burlakova SS. Standardized histological methods for assessing the quality of meat and meat products. *All about Meat*. 2011;6:32-35.
10. Pchelkina VA. Possibilities of using the image analysis system for research of meat raw materials and products. *Tech Food Prod Tech*. 2016;43(4):70-75.
11. Hassoun A, Mâge I, Schmidt WF, et al. Fraud in animal origin food products: advances in emerging spectroscopic detection methods over the past five years. *Foods*. 2020; 9:1069. [\[Crossref\]](#)
12. Field RA. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. *Meat Sci*. 2000;55(3):255-264. [\[Crossref\]](#)
13. Usatenko N, Okhrimenko Y, Svyrydenko T, Martynenko L, Klischova T. Non-traditional raw meat materials. *Food Proc Industry*. 2009;9-10:14-17.
14. DSTU-N RMG 61:2006 Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical analysis. Methods of determination (RMG 61:2003, IDT), DP UkrNDNTs, Kyiv.
15. Poultry Meat Processing (AR Sams - ed.), 2001. 335, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
16. Gonotskiy VA, Fedina LP, Khvylyia SI, Krasnyukov YuN, Abaldova VA. Mechanically deboned poultry, Alfa-Design, Moscow, 2004.
17. GSTU 46.070-2003. Poultry meat deboned mechanically. General specifications, Ministry of Agrarian Policy of Ukraine, Kyiv, 2003.
18. Code of Federal Regulations. Mechanically separated (kind of poultry), 2007. 9 C.F.R. §381.173. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
19. TIMM UAAN. Investigating the composition of mechanically deboned poultry meat and developing a method for determining the content of bone inclusions in meat products: Research report. KP 00419880. State Registration Number 0109U002612 (Superv. Usatenko NF., exec. Okhrimenko YI.), 48, Dairy and Meat Technological Institute, Kyiv, 2010.
20. DSTU 4435:2005 Semi-smoked sausages. General specifications. Derzhspozhivstandart Ukrainy, Kyiv, 2006: 23.
21. DSTU 4436:2005 Boiled sausages, frankfurters, sardellas, meat loaves. General specifications. Derzhspozhivstandart Ukrainy, Kyiv, 2006: 35.
22. GOST 8.010-2013 State system for ensuring the uniformity of measurements. Procedures of measurements. Main principles, Standardinform, Moscow, 2019: 102.
23. Usatenko NF, Okhrimenko YI, Martynenko LH. A new method to control the quality of meat products. *Bull Agricul Sci*. 2012;7:61- 63.
24. Methods for measuring the mass fraction of bone inclusions in meat products by the gravimetric method (Certificate MVV 081/12-0690-10 of 30 June 2010).
25. Bondar S, Voitsekhivska L, Verbytskyi S, Okhrimenko Y, Klyshova T, Sokolova S. Study of dependence of content of bone inclusions in mechanically separated poultry from temperature and type of raw material. *Food Resources*. 2017;8:86-92.

26. Nagdalian AA, Rzhepakovsky IV, Siddiqui SA. Analysis of the content of mechanically separated poultry meat in sausage using computing microtomography. *J Food Composition Analy.* 2021;100:103918. [\[Crossref\]](#)
27. Crosland AR, Patterson RLS, Higman RC, Stewart CA, Hargin KD. Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - I: chemical composition. *Meat Sci.* 1995;40(3):289-302. [\[Crossref\]](#)
28. Todorova ID, Nikolaeva GD, Ivanova YK. Technological opportunities for enhancing the quality of dietary, cooked sausages through use of dairy additives. *Sci Tech Educ.* 2021;2-1(77):16-20.
29. Kang KM, Lee SH, Kim HY. Quality properties of whole milk powder on chicken breast emulsion-type sausage. *J Animal Sci Tech.* 2021;63(2):405-416. [\[Crossref\]](#)
30. AOAC Official Method 983.19. Calcium in Mechanically Separated Poultry and Beef. Titrimetric Method.
31. Pickering K, Evans CL, Hargin KD, Stewart CA. Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - III: microscopy. *Meat Sci.* 1995;40:319-326. [\[Crossref\]](#)
32. Tremlova B, Sarha P, Pospiech M. Histological analysis of different kinds of mechanically recovered meat. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* 2006;57(3):85-91.
33. Groves K. Evaluation of simple microscopy protocol for identifying mechanically separated meat in pork, chicken and turkey. *Leatherhead Food Res.* 2011;8:1-52.
34. Laszkiewicz B, Szymanski P, Kołozyn-Krajewska D. Quality problems in mechanically separated meat. *Medycyna Weterynaryjna.* 2019;75:6157. [\[Crossref\]](#)
35. Iammarino M, Miedico O, Petrella A, Mangiacotti M, Chiaravalle AE. Innovative approaches for identifying a mechanically separated meat: evaluation of radiostromium levels and development of a new tool of investigation. *J Food Sci Tech.* 2020;57(2):484-494. [\[Crossref\]](#)
36. Salins SS, Siddiqui SA, Reddy SVK, Kuma S. Experimental investigation on the performance parameters of a helical coil dehumidifier test rig. *Energy Sources Part A Recovery Utilization and Environmental Effects.* 2021;43(1):35-53. [\[Crossref\]](#)
37. Tomaiuolo M, Mangiacotti M, Chiaravalle E, Iammarino M. Innovative techniques for identifying a mechanically separated meat: sample irradiation coupled to electronic spin resonance. *Eur Food Res Tech.* 2019;245(10):2331-2341. [\[Crossref\]](#)
38. Schmidt Andersen MB, Frydenvang J, Henckel P, Rinnan A. The potential of laser-induced breakdown spectroscopy for industrial at-line monitoring of calcium content in comminuted poultry meat. *Food Control.* 2016;64:226-233. [\[Crossref\]](#)
39. Wubshet SG, Wold JP, Böcker U, Sanden KW, Afseth NK. Raman spectroscopy for quantification of residual calcium and total ash in mechanically deboned chicken meat. *Food Control.* 2019;95:267-273. [\[Crossref\]](#)
40. Coşkun AG, Temelli S, Eyigör A. Mekanik ayrılmış kanatlı eti: özellikleri, güncel kullanım alanları ve ilgili mevzuat. *Vet Hek Der Derg.* 2019;90(2):164-177. [\[Crossref\]](#)
41. Wieja K, Kietczyński P, Szymański P, Szalewski M, Balcerzak A, Ptasznik S. Identification and investigation of mechanically separated meat (MSM) with an innovative ultrasonic method. *Food Chemistry.* 2021;348:128907. [\[Crossref\]](#)
42. Law of Ukraine On Consumer Rights Protection of 12 May 1991, No 1023-XII, Verkhovna Rada Ukrainy, Kyiv.

Effect of Bromelain Against Nickel Genotoxication in Rats

Sıçanlarda Nikel Genotoksikasyonuna Karşı Bromelainin Etkisi

Füsün TEMAMOĞULLARI¹ 
Pınar AKSU KILIÇLE² 
Şükrü GÜRLER³ 
Zozan GARİP¹ 

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Şanlıurfa, Turkey

²Department of Biology, Kafkas University, Faculty of Arts and Sciences, Kars, Turkey

³Department of Genetics, Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Şanlıurfa, Turkey

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the protective role of bromelain against nickel sulfate genotoxication. Twenty-four healthy adult male Sprague Dawley rats with an average weight of 200 ± 20 g were used in the study. These were divided randomly into four groups ($n = 6$), including one control and three experimental groups: Group 1 (control), Group 2 (nickel sulfate 20 mg/kg, intraperitoneal [IP]), Group 3 (Bromelain 20 mg/kg, oral gavage), Group 4 (nickel sulfate 20 mg/kg IP + bromelain 20 mg/kg oral gavage). After the ten-day experimental period, the animals were euthanized on the 11th day. Femoral bones were taken from animals dissected on day 11, and micronucleus protocol was applied. At the end of the protocol, micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and polychromatic erythrocytes (PCE) were counted. The statistical results of the counted values were determined. The groups were compared only according to MNCPE, the level of which was statistically significant in the group with bromelain than in the group with nickel sulfate alone ($P < .05$). The data obtained suggested that bromelain at the administered dose (20 mg/kg) is not potentially preventive to the genotoxic effects of nickel sulfate at the administered dose (20 mg/kg).

Keywords: Bromelain, genotoxicity, nickel sulfate, rat

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, nikel sülfat genotoksikasyonuna bromelainin karşı koruyucu rolünü araştırmaktır. Çalışmada, ortalama 200 ± 20 gr ağırlığında yirmi dört sağlıklı yetişkin erkek Sprague dawley sıçan kullanıldı. Rastgele olacak şekilde dört grup ($n = 6$) oluşturuldu. Sıçanlar bir kontrol ve üç deney grubu: Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (Nikel sülfat 20 mg/kg, ip), Grup 3 (Bromelain 20 mg/kg, oral gavaj), Grup 4 (Nikel sülfat, 20 mg/kg, ip + bromelain, 20 mg/kg, oral gavaj). On günlük deney periyodundan sonra hayvanlar on birinci gün ötenazi edildi. 11. günde ötenazi edilen hayvanlardan femur kemikleri alındı ve mikronükleus protokolü uygulandı. Protokolün sonunda MNPCE (mikronükleuslu polikromatik eritrositler) ve PCE (polikromatik eritrositler) sayıldı. Sayılan değerlerin istatistiksel sonuçları belirlendi. Tüm gruplar sadece MNCPE parametresine göre karşılaştırıldı. MN-CPE seviyesi, bromelainli grupta, sadece nikel sülfatlı grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı ($P < .05$). Elde edilen veriler, bromelainin 20 mg/kg dozunda uygulanması, 20 mg/kg dozunda uygulanan nikel sülfatın oluşturduğu genotoksik etkilerini potansiyel olarak önleyici olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bromelain, genotoksite, nikel sülfat, rat.

INTRODUCTION

Excessive or long-term intake of metals found in nature, which are needed in small amounts for the regulation of normal vital functions, gives rise to multiple health problems. Nickel, a carcinogenic, genotoxic, teratogenic, and immunotoxic heavy metal, is an environmental pollutant that is not necessary for vital functions. People are particularly exposed to nickel through nickel-contaminated vegetables, spinach, legumes, nuts, and tobacco containing nickel. It has been stated that there is a high amount of nickel, especially in products containing cocoa powder and baking powder.¹⁻³ In addition, nickel causes food contamination through hydrogenation of vegetable oils and some processes applied to foods with tools and equipment and environmental pollution through processes using nickel in intensive steel and battery production and releasing it to the atmosphere during mining, smelting, and refining. Humans and

animals intake nickel through respiration, food, and skin absorption resulting in tissue and organ damage from nickel accumulation.⁴ Nickel binds tightly to bases in DNA and RNA in living organisms; phosphate groups; nucleotides such as ATP and thiamine pyrophosphate; amino acids such as methionine, cysteine, histidine, and pyrroline; proteins; peptides; and phospholipids; and substances such as acetyl coenzyme A, dihydrolipoic acid, pyridoxal and pyridoxamine and blocks various enzymes (such as aspartase, alkaline phosphatase, and ATPase) and makes iodine unavailable to the thyroid gland.⁵ Multiple studies have determined that nickel increases lipid peroxidation in various tissues such as blood, liver, muscle, and kidney and causes oxidative stress.^{6,7}

In recent years, interest in the use of various antioxidant substances as food supplements has been increasing rapidly to prevent the harmful effects of xenobiotics.⁸ Bromelain is a natural pro-

Received/Geliş Tarihi: 29.12.2021

Accepted/Kabul Tarihi: 29.03.2022

Corresponding Author/Sorumlu Yazar:
Füsün TEMAMOĞULLARI
E-mail: farmafto@gmail.com

Cite this article: Temamoğulları F, Aksu Kılıçle P, Gürler Ş, Garip Z. Effect of bromelain against nickel genotoxication in rats. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 26-30.

Atif: Temamoğulları F, Aksu Kılıçle P, Gürler Ş, Garip Z. Sıçanlarda Nikel Genotoksikasyonuna Karşı Bromelainin Etkisi. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 26-30.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

tein decomposer found in pineapple, which has antimetastatic, immunomodulatory, anti-edema, anti-inflammatory, antithrombotic,⁹ antioxidant,^{10,11} tissue regeneration enhancing, and pain reliever effects.¹²

Previous studies have reported that bromelain and fresh pineapple juice have DNA protective potential, reduce cytotoxicity, and have antigenotoxic and antimutagenic effects.¹³⁻¹⁷

In this study, we aimed to evaluate the effects of bromelain on genotoxicity against intraperitoneal nickel sulfate administration in rats.

MATERIAL AND METHODS

All the experimental protocols in this study were carried out in the Experimental Research Center of Harran University. Ethical approval permission was given by the Harran University Animal Experiments local ethics committee (Date: April 5, 2017, No: 12541).

Animals

In our experiments, adult male rats ($n = 24$, Sprague-Dawley, 6 weeks old weighing 200 ± 20 g) were obtained from an experimental research unit at Firat University. In classic laboratory conditions (12 h light and 12 h dark, $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 60%–65% humidity), the animals were fed with a routine diet. Food and water were provided *ad libitum*.

Experimental Design

A total of 24 Sprague-Dawley rats, six in each group, were used. The study was planned as follows: Group 1 control (normal saline intraperitoneal injection [IP]); Group 2 with nickel sulfate (Acros Organics nickel sulfate heptahydrate, Code: 270552500, Lot: A0371683) 20 mg/kg IP^{6,18}; Group 3 with bromelain (Sigma B4882 List 647-014-00-9 Cas No 37189-34-7) 20 mg/kg oral gavage^{19,20}; Group 4 with nickel sulfate (20 mg/kg, IP) + bromelain (20 mg/kg oral gavage). After 10 days of administration, tissue samples were taken after euthanasia on the 11th day.

In the study, bone marrow was used for micronucleus detection. The removed femur bone was cut from both ends and transferred to a centrifuge tube containing 3 mL of calf serum with the help of a bone marrow injector. Tubes containing bone marrow samples were centrifuged at 2000 rpm for five minutes, and supernatants were discarded. It was suspended by placing a drop of calf serum on the part remaining in the tube. A drop of sample from it was spread on clean slides. After the spreading process, the slides were air-dried and fixed in methyl alcohol for 10 minutes. Bone marrow preparations were prepared by a method that was first developed by Schmid²¹ and adapted to this laboratory and working conditions.

Staining Method

The fixed preparations were first stained with 0.25% May Grunwald dye for five minutes and washed with distilled water. It was then stained with 0.125% May Grunwald dye for five minutes and washed in distilled water. Finally, it was stained with 20% Giemsa dye for 30 minutes, washed, and left to dry. The preparations were examined through an Olympus CX21 light microscope at 1000x magnification, and 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) were counted randomly from each preparation. Among these, the numbers of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) were determined, and their percentages were calculated.

Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test of normality was used to determine whether the data were suitable for normal distribution. Statistical analysis of the data obtained from the study were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences version 22 (IBM SPSS Corp., Armonk, NY, USA) statistical program. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether there was a difference between the means of the experimental group or not; and if there was a difference between the means of the experimental groups, the “ANOVA-Duncan” test was applied to the group averages to determine which group or groups showed a difference, and $P < .05$ was considered statistically significant. Results were presented as mean \pm standard deviation ($X \pm \text{SD}$).

RESULTS

In this study, all the groups were compared in terms of the single parameter, MNPCE. As a result of the analysis, the MNPCE level in the group with bromelain was statistically different from the group with nickel sulfate+bromelain and the group with nickel sulfate ($P < .01$). There was no statistically significant difference between the bromelain group and the negative control group ($P > .05$). Again, the difference between the nickel sulfate group and the nickel sulfate + bromelain group was not statistically significant ($P > .05$) (Table 1, Figure 1). Images of MNPCE and normal PCE and NCEs ($\times 1000$) in the bone marrow obtained from nickel sulfate group are shown in Figure 2.

Table 1. Statistical data of groups in terms of MNPCE

Parameters	Groups				P
	Bromelain (20 mg/kg)	Nickel sulphate (20 mg/kg) +Bromelain (20 mg/kg)	Nickel sulphate (20 mg/kg)	Negatif control	
MNPCE (Mean \pm SD)	6.67 \pm 1.21 ^a	19.83 \pm 1.47 ^b	20.33 \pm 1.03 ^b	6.00 \pm 1.41 ^a	*

* $P < .01$: Statistically significant difference, a,b: Values with different letter indicate significant differences. SD, Standard deviation

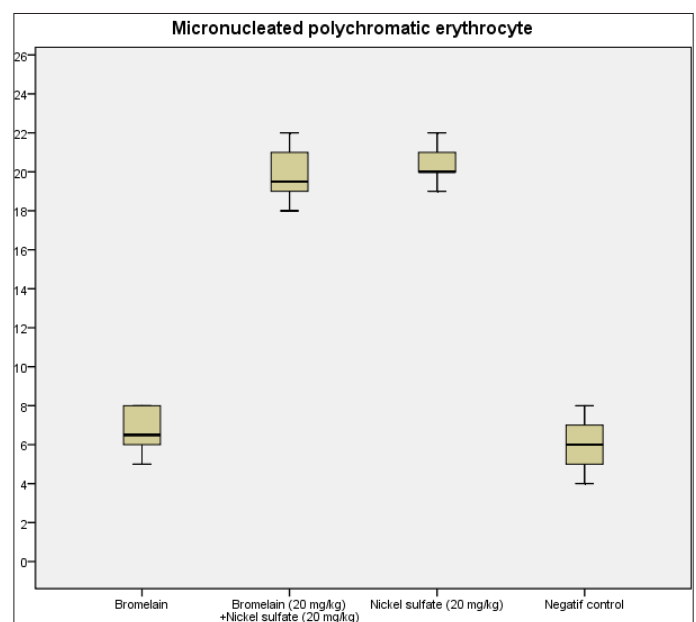


Figure 1. Box graphic showing the numbers of polychromatic erythrocytes with micronucleus based on groups

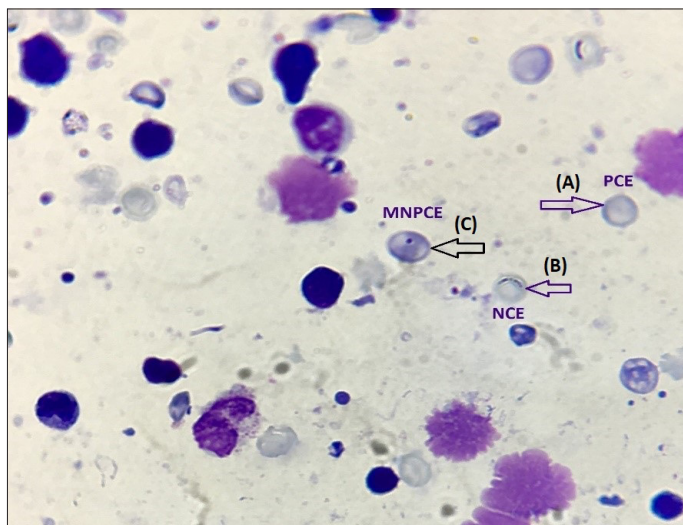


Figure 2. In the bone marrow of rats, images of normal PCE and NCEs, and MNPCE (x1000). PCE, Polychromatic Erythrocyte; NCE, Normochromic Erythrocyte; MNPCE, Micronucleated Polychromatic Erythrocyte

DISCUSSION

It is known that nickel compounds damage cell DNA through free radicals. Nickel causes oxidative damage to DNA as well as transduction and replication problems. The water-soluble nature of nickel sulfate increases the carcinogenicity of the substance and thus the mutation potential.^{22,23} Many *in vivo* and *in vitro* studies have been conducted on the genotoxic effects of nickel.²⁴⁻²⁷ To determine the genotoxicity, comet assay, Salmonella/microsome mutagenicity (AMES) test, sister chromatid exchange assay, chromosome abnormality test, and micronucleus test were performed.²⁸ According to the literature review, it is noted that bone marrow²⁹⁻³² and embryos⁵ were used to determine genotoxicity.

In a study, genotoxicity of nickel sulfate hexahydrate was investigated in rats through micronucleus test. In the study, it was determined that nickel sulfate hexahydrate increased the micronucleus frequency in bone marrow cells.^{22,27} In another study, it was determined that it increased the kinetochore positive nucleus on human diploid fibroblasts.²⁵ In this study, we determined that there was a statistically significant difference in MNPCEs in the group with nickel sulfate than that in the other groups ($P < .01$). This result is compatible with other studies which support the idea that nickel sulfate is genotoxic. The increase in the number of PCEs is an indicator of chromosomal damage or cytogenetic damage caused by anaphase delay.²⁸ PCE/NCE ratio is also expressed as a bone marrow cytotoxicity marker.²⁹

Currently, many people support the inclusion of antioxidant substances in diets to protect themselves from the possible harmful effects of environmental pollutants.^{33,34} Bromelain, an antioxidant, prevents tumor cell proliferation. It has been determined that bromelain inhibits the proliferation and development of oral cancer cells.³⁵ It has been determined that bromelain used during sperm freezing to improve sperm quality in goats is not genotoxic.³⁶

It has been stated that bromelain can prevent the formation of reactive oxygen groups in the cell. Thus, it can prevent genotoxicity by disrupting the interaction between advanced glycation end products (AGEs) and their receptors (RAGE).³⁷ In a study examin-

ing the genotoxicity of AGE on pig kidney, it was stated that bromelain reduced cell damage and genotoxicity.³⁸

In the study by Sen et al.,³⁹ it was determined that application of 20 mg/kg bromelain protects the sperm DNA fragmentation rate against the damage caused by nickel in the testis, reducing the damage and oxidative stress caused by nickel, and improving sperm quality.

In the literature review, there are various studies in which pineapple and pineapple products were used against the harmful effects of various substances that cause mutagenic effects.

Ikken et al.⁴⁰ determined that ethanolic pineapple extract has an antimutagenic effect against the effects of mutagenic nitrosamines. Kurdi¹⁴ stated that pineapple juice had positive results in the micronucleus test against the cytotoxic and genotoxic effects of the antineoplastic drug, ifosfamide, in PCEs of the bone marrow. In another study, it was determined that fresh pineapple juice (0.4 mL/kg/day, oral) was effective in reducing lethal mutation against the side effects of ifosfamide in spermatogenesis stages (early spermatids, primary spermatocytes and spermatozoa, and late spermatid stages) in albino rats.³⁰ It has been reported that pineapple scavenges reactive oxygen species and protects nucleophilic regions in the DNA.¹⁵ The *in vivo* antitumoral/antileukemic effect of bromelain has been evaluated in different cell lines.⁴¹

The protective effect of pineapple juice against genotoxicity caused by mutagenic heterocyclic aromatic amines in hamster fibroblasts was determined by the comet assay.¹⁶

In a study by Sah et al.,⁴² the antimutagenic effect of peel powder of pineapple on the yogurt bacteria *Lactobacillus* was confirmed by the Ames test.

The reason for the difference in the results of *in vivo* and *in vitro* studies may be owing to the pharmacokinetics of the drug in live animals, nutrition, genetic structure, stress, and environmental factors.^{12,43} In this study, the antigenotoxic effect of bromelain administered via oral gavage at the same amount was not found in rats administered NiSO_4 (20 mg/kg) IP for 10 days. This may be because of the *in vivo* nature of our study.

In the studies conducted by Kurdi,^{14,30} it was stated that pineapple juice has an antigenotoxic effect against the cytotoxic and genotoxic effects of ifosfamide in PCEs in the bone marrow and semen formation stages in the micronucleus test. However, because of the presence of different phytochemical structures (such as ascoumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid, and ellagic acid), vitamins (vitamin C, pyridoxine, thiamine, and riboflavin), and minerals (copper and manganese) in pineapple apart from bromelain,¹⁵ these studies do not prove that bromelain alone is effective against genotoxicity.

Drugs and chemicals are primarily dispersed into organs and tissues (brain, heart, kidney, etc.) via blood vessels; and after reaching a certain blood density, they accumulate in fat, bone tissue, nucleic acid, and keratinous structures.⁵ Bone tissue has less perfusion than the vital organs.⁴⁴ There are many studies conducted on the harmful effects of nickel compounds on the liver, kidney, testes, and sperm causing oxidative stress in living organisms.^{6,45-47} In the study by Sen et al.,³⁹ bromelain showed a protective effect against the harmful effects of NiSO_4 on sperm DNA. However, there are different studies in which bromelain does not show a protective effect against genotoxicity. This may be owing

to the different accumulation tendencies of nickel in testicular and bone marrow and the different tissue and perfusion rates of the testes and bone marrow.^{44,48}

In conclusion, it was determined that bromelain (20 mg/kg) did not have a protective effect against the genotoxic effects of nickel sulfate.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Harran University (Date: April 5, 2017, No: 12541).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – F.T.; Design – F.T.; Supervision – F.T., Z.G.; Resources – F.T., Z.G.; Data Collection and/or Processing – F.T., P.A.K., Z.G.; Analysis and/or Interpretation – S.G., F.T., P.A.K., Z.G.; Literature Search – F.T., Z.G.; Writing Manuscript – F.T., P.A.K., Z.G.; Critical Review – F.T., S.G., P.A.K.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Harran Üniversitesi'nden (Tarih: 5 Nisan 2017, No: 12541) alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – F.T.; Tasarım – F.T. ; Denetleme – F.T., Z.G.; Kaynaklar – F.T., Z.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – F.T., P.A.K, Z.G.; Analiz ve/veya Yorum – S.G., F.T., P.A.K., Z.G.; Literatür Taraması – F.T., Z.G.; Yazıyı Yazan – F.T., P.A.K., Z.G.; Eleştirel İnceleme – F.T., S.G., P.A.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.



REFERENCES

- Cempel M, Nikel G. Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Pol J Environ Stud.* 2006;15(3):375-382.
- Adjroud O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environ Toxicol.* 2013;28(5):290-298. [\[Crossref\]](#)
- Owumi SE, Olayiwola YO, Alao GE, Gbadegesin MA, Odunola OA. Cadmium and nickel co-exposure exacerbates genotoxicity and not oxidative-inflammatory stress in liver and kidney of rats: Protective role of omega-3 fatty acid. *Environ Toxicol.* 2020;35(2):231-241. [\[Crossref\]](#)
- Cameron KS, Buchner V, Tchounwou PB. Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review. *Rev Environ Health.* 2011;26(2):81-92. [\[Crossref\]](#)
- Kaya S. *Veteriner Toksikoloji.* 3th ed., 50-528, Medisan Yayınevi, Ankara, 2014.
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res.* 2008;128(4):412-425.
- Bhardwaj H, Singh C, Nayyar S. Assessment of adverse effects of lead, nickel and cadmium on biochemical parameters, antioxidants status and metallothionein expression in buffaloes slaughtered at local abattoir. *Indian J Anim Res.* 2021;1-8. DOI:10.18805/IJAR.B-4242. [\[Crossref\]](#)
- Badr AN, Abdel-Razek AG, Youssef MM, Shehata MG, Hassanein MM, Amra HA. Natural antioxidants: preservation roles and mycotoxicological safety of food. *Egypt J Chem.* 2021;64:4-5.
- Rathnavelu V, Alitheen NB, Sohila S, Kanagesan S, Ramesh R. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. *Biomed Rep.* 2016;5(3):283-288. [\[Crossref\]](#)
- Şehirli AÖ, Sayiner S, Savtekin G, Veliöğlu-Öğünç A. Protective effect of bromelain on corrosive burn in rats. *Burns.* 2021;47(6):1352-1358. [\[Crossref\]](#)
- Huang CW, Lin IJ, Liu YM, Mau JL. Composition, enzyme and antioxidant activities of pineapple. *Int J Food Prop.* 2021;24(1):1244-1251. [\[Crossref\]](#)
- Kaya S. *Veteriner Farmakoloji.* 5 th ed., 291, Medisan Yayınevi, Ankara, 2013.
- Taşkın A, Tarakçıoğlu M, Ulusal H, Örkmez M, Taycı S. Idarubicin-bromelain combination sensitizes cancer cells to conventional chemotherapy. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(10):1172.
- Kurdi LAF. The ability of fresh pineapple juice in reducing the cytogenetic effect of ifosfamide on the bone marrow cells of male albino mice. *Adv Environ Biol.* 2016;10:120-130.
- Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, SánchezGutiérrez M, et al. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients.* 2017;9(2):102. [\[Crossref\]](#)
- Platt KL, Edenharder R, Aderhold S, Muckel E, Glatt H. Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2010;703(2):90-98. [\[Crossref\]](#)
- Stopper H, Schinzel R, Sebekova K, Heidland A. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett.* 2003;190(2):151-156. [\[Crossref\]](#)
- Pari L, Amudha K. Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 2011;650(1):364-370. [\[Crossref\]](#)
- Al-Otaibi WR, Virk P, Elobeid M. Ameliorative potential of stem bromelain on lead-induced toxicity in Wistar rats. *Acta Biol Hung.* 2015;66(2):149-160. [\[Crossref\]](#)
- Eckert K, Grabowska E, Stange R, Schneider U, Eschmann K, Maurer HR. Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from mammary tumor patients. *Oncol Rep.* 1999;6(6):1191-1200. [\[Crossref\]](#)
- Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;31:9-15. [\[Crossref\]](#)
- Botta A, Lehucher Michel MP, Di Giorgio C. Genotoxic effects of nickel sulfate in cultured human lymphocytes. *Med Sci Res.* 1994;22:709-710.
- Rizvi A, Parveen S, Khan S, Naseem I. Nickel toxicology with reference to male molecular reproductive physiology. *Reprod Biol.* 2020;20(1):3-8. [\[Crossref\]](#)
- Salimi A, Jamali Z, Atashbar S, Khezri S, Ghorbanpour AM, Etefaghi N. Pathogenic mechanisms and therapeutic implication in nickel-induced cell damage. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2020;20(7):968-984. [\[Crossref\]](#)
- Seoane AI, Dulout FN. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2001;490(2):99-106. [\[Crossref\]](#)
- M'Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK. Nickel compound-induced DNA single-strand breaks in chromosomal and nuclear chromatin in human blood lymphocytes in vitro: role of oxidative stress and intracellular calcium. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2005;586(2):124-137. [\[Crossref\]](#)
- Oller AR, Erexson G. Lack of micronuclei formation in bone marrow of rats after repeated oral exposure to nickel sulfate hexahydrate. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2007;626(1-2):102-110. [\[Crossref\]](#)
- Şekeroğlu V, Şekeroğlu ZA. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Derg.* 2011;4:221-229.
- Polat F, Bingöl G, Turaclar N. An investigation of micronucleus induction by butylated hydroxytoluene in wistar rat bone marrow cells. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2014;20(4):527-531.
- Kurdi LAF. Effectiveness of preventive of fresh pineapple juice against the genotoxicity effects of ifosfamide on albino mice. *Adv Environ Biol.* 2016;10:276-293.
- Özparlak H, Arslan A, Güler GÖ. Organik insektisit Fipronil'in genotoksik etkilerinin civciv mikronucleus test sisteminde belirlenmesi. *Selçuk Univ Fen Fak Fen Derg.* 2011;2(37):1-8.

32. Ulu H, Kılıçle PA. Fare kemik iliği hücrelerinde siklofosamid tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı tarhun (*Artemisia dracunculoides* L.) yaprak ekstraktının olası koruyucu etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi. *Caucasian Med J*. 2020;7(2):92-108. [\[Crossref\]](#)
33. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:313-329. [\[Crossref\]](#)
34. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *MAEU Vet Fak Derg*. 2016;1(1):65-76. [\[Crossref\]](#)
35. Lee JH, Lee JT, Park HR, Kim JB. The potential use of bromelain as a natural oral medicine having anticarcinogenic activities. *Food Sci Nutr*. 2019;7(5):1656-1667. [\[Crossref\]](#)
36. Castro e Braga C, Teixeira LSD, Nascimento WM, et al. Use of bromelain in the quality of frozen/thawed goat Sêmen. *Cienc Anim*. 2020;30:261-265.
37. Amini A, Masoumi-Moghaddam S, Morris DL. Bromelain. In "Utility of Bromelain and N-Acetylcysteine in Treatment of Peritoneal Dissemination of Gastrointestinal Mucin-Producing Malignancies", Springer, Cham, 2016: 63-80. [\[Crossref\]](#)
38. Stopper H, Schinzel R, Sebekova K, Heidland A. Genotoxicity of advanced glycation and products in mammalian cells. *Cancer Lett*. 2003;190(2):151-156. [\[Crossref\]](#)
39. Sen CC, Temamogullari F, Yumusak N, Kirit A. Bromelain prevented nickel-induced testicular toxicity via suppression of sperm DNA fragmentation and sperm quality alterations in rats. *Med Weter*. 2019;75(5):558-563. [\[Crossref\]](#)
40. Ikken Y, Morales P, Martínez A, Marín ML, Haza AI, Cambero MI. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *J Agric Food Chem*. 1999;47(8):3257-3264. [\[Crossref\]](#)
41. Báez R, Lopes MT, Salas CE, Hernandez M. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. *Planta Med*. 2007;73(13):1377-1383. [\[Crossref\]](#)
42. Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. Effect of refrigerated storage on probiotic viability and the production and stability of antimutagenic and antioxidant peptides in yogurt supplemented with pineapple peel. *Int J Dairy Sci*. 2015;98(9):5905-5916. [\[Crossref\]](#)
43. Garip Z, Temamogullari F. Silkworm in pharmacology and toxicology. *Int JVAR*. 2021;4(1):34-38.
44. Prisby RD. Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone. *J Endocrinol*. 2017;235(3):R77-R100. [\[Crossref\]](#)
45. Athar M, Misra M, Srivastava RC. Evaluation of chelating drugs on the toxicity, excretion, and distribution of nickel in poisoned rats. *Toxicol Sci*. 1987;9(1):26-33. [\[Crossref\]](#)
46. Doreswamy K, Shrilatha B, Rajeshkumar T. Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. *J Androl*. 2004;25:996-1003. [\[Crossref\]](#)
47. Singh M, Verma Y, Rana SVS. Attributes of oxidative stress in the reproductive toxicity of nickel oxide nanoparticles in male rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2022;29(4):5703-5717. [\[Crossref\]](#)
48. Karakaya E. *Testis Torsiyonunun Detorsiyonu Sonrasında Oluşan Iske-mi/Reperfüzyon Hasarının Rosuvastatin ile Önlenilebilirliği*. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 2006.

Prevalence of Canine Cardiac Dirofilariasis in Nineveh Governorate of Iraq

Irak'ın Nineveh Vilayetinde Köpek Kardiyak Dirofilariosis Prevalansı

Maab Ibrahim AL-Farwachi 
Haneen Badran ALmelachi 

Department of Internal and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq



* This article is derived from a Master of Science thesis supported by College of Veterinary Medicine, University of Mosul.

Received/Geliş Tarihi: 27.02.2022

Accepted/Kabul Tarihi: 28.04.2022

Corresponding Author/Sorumlu Yazar:
Maab Ibrahim AL-Farwachi
E-mail: maabalfwche@yahoo.com

Cite this article: AL-Farwachi MI, ALmelachi HB. Prevalence of canine cardiac dirofilariasis in Nineveh Governorate of Iraq. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 31-34.

Atf: AL-Farwachi MI, ALmelachi HB. Irak'ın Nineveh Vilayetinde köpek kardiyak dirofilariosis prevalansı. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(1), 31-34.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

ABSTRACT

Canine cardiac dirofilariasis is a parasitic zoonotic disease caused by *Dirofilaria immitis*. This research work is aimed to find out the prevalence of both a microfilaremic (patent infection) and occult forms (amicrofilaremic form) of cardiac dirofilariasis in stray and police dogs of Nineveh governorate (in northwestern Iraq). From October 2021 to January 2022, the blood of ninety dogs of various breeds, including 45 local breeds stray dogs and 45 police dogs, mostly of Belgian Malinois and German Shepherd breeds, with an age range of 1 to 11 years (median: 4.5 years), were examined microscopically by wet mount, acridine orange stained blood smears and modified Knott's test to detect circulating microfilaria. All the samples were further tested by a commercial antigen-enzyme-linked immune sorbent assays kit (Heartworm Ag ELISA kit, Canine, DRG International Inc., USA) in order to detect dogs with occult cardiac dirofilariasis. A total of 49 samples were microfilaria positive, giving a prevalence value of 54.4%. *D.immitis* antigens were detected in 27.8% of the examined sera, with an overall prevalence of 78.9%. Stray dogs showed a higher prevalence for both microfilaremia and occult forms of cardiac dirofilariasis compared to police dogs in Nineveh Governorate of Iraq. The agreement between the modified Knott's test (Gold standard) and wet mount, acridine orange stained blood smears, and Ag ELISA using Cohen's Kappa index was light for the wet mount (0.030) and substantial for Ag ELISA (0.462), and acridine orange stained blood smears (0.607). The findings of the present study provide evidence for the prevalence and pattern of canine cardiac dirofilariasis in dogs (both stray and police) in Iraq's Nineveh Governorate, requiring a phylogenetic analysis.

Keywords: Canine, cardiac dirofilariosis, *Dirofilaria immitis*, prevalence.

Öz

Kanin kardiyak dirofilariosis, *Dirofilaria immitis*'in neden olduğu parazitik zoonotik bir hastalıktır. Bu araştırma çalışması, Nineveh Vilayeti'nde (kuzeybatı Irak'ta) sokak ve polis köpeklerinde kardiyak dirofilariosisin hem mikrofilaremik (patent enfeksiyonu) hem de occult formlarının (amicrofilaremik form) prevalansını belirlemeyi amaçlamaktadır. Ekim 2021 - Ocak 2022 tarihleri arasında, 1-11 yaş arası (ortalama: 4,5 yaş) çoğu Belçika Malinois ve Alman Çoban ırkı olmak üzere 45 yerel sokak köpeği ve 45 polis köpeği dahil olmak üzere çeşitli ırklardan doksan köpeğin kanı, dolaşımdaki mikrofilariya'yı saptamak için wet mount, kan smeari acridine orange boyaması ve modifiye Knott testi ile mikroskopik olarak incelendi. Tüm numuneler, ayrıca occult kardiyak dirofilaryozlu köpekleri saptamak için ticari bir enzim bağlantılı immün emici tahlil kiti (Heartworm Ag ELISA kiti, Canine, DRG International Inc., ABD) ile test edildi. Toplam 49 örnek mikrofilariya pozitif ve prevalans değeri %54.4 idi. İncelenen serumun %27.8'inde *D.immitis* antijenleri tespit edildi ve genel prevalansı %78.9 idi. Sokak köpekleri, Irak'ın Ninova Vilayeti'ndeki polis köpeklerine kıyasla hem mikrofilaremik hem de occult kardiyak dirofilariyoz formları için daha yüksek prevalans gösterdi. Modifiye Knott testi (Altın standart) ile wet mount, kan smeari acridine orange boyaması ve Cohen'in Kappa indeksi kullanılarak Ag ELISA arasındaki uyum, wet mount (0.030) için hafifti ve Ag ELISA (0,462) ve kan smeari acridine orange boyaması için önemliydi (0.607). Bu çalışmanın bulguları, Irak'ın Nineveh Vilayeti'ndeki köpeklerde (hem sokak hem de polis) kardiyak dirofilariosis prevalansı ve paterni için filogenetik bir analiz gerektiren kanıtlar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Köpek, kardiyak dirofilariosis, *Dirofilaria immitis*, yaygınlık.

INTRODUCTION

Dirofilaria immitis (heartworm [HW]) is mosquito-borne filarial nematode capable of causing canine cardiac dirofilariasis commonly known as the heartworm disease owing to the location of the adult worm in the right ventricle of the heart and occasionally in the arteries of the lungs, resulting in the production of blood-circulating microfilariae^{1, 2}. HW can be diagnosed using microfilariae detection tests, serological (i.e., enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]) and immunochromatographic tests for the

detection of somatic and female antigens of *D. immitis* adults, radiography, and blood analysis³. Microfilariae testing may be aided by parasitological tests (wet mount, thin and thick blood smear, buffy coat method, and modified Knott's test). Microfilaria species can be distinguished using Morphological keys, histochemistry^{4, 5, 6}, and molecular tests (polymerase chain reaction [PCR])⁷. Canine heartworm antigenemia (Ag ELISA) are simple to perform, susceptible, and highly specific⁸. However, because Ag ELISA has a low rate of false positive outcomes, a positive result usually suggests a current infection^{3, 9}.

Cardiac dirofilariasis has been studied exhaustively, showing great regional and local variations in their prevalence worldwide¹⁰. The prevalence of cardiac dirofilariasis in dog population based on results of Anvari et al., (2020)¹¹ throughout the world and Asia was 10.91% and 12.07%, respectively. *D. immitis* is widely distributed in the canine population of Mediterranean and Middle Eastern countries, including Egypt¹², Turkey^{13; 14; 15}, Saudi Arabia¹⁶, Iran¹⁷, and Iraq^{18; 19}. In Iraq, the disease is diagnosed mainly in the southern provinces (Karbala, Al-Qadisiyah, and Dhi-Qar Provinces) of the country^{20; 21}. This study was designed and conducted to determine the prevalence of both microfilaremic (patent) and occult (amicrofilaremic) forms of cardiac dirofilariasis using wet mount, acridine orange stained blood smears, modified Knott's, test and antigen ELISA in stray and police dogs from Nineveh Governorate in northwestern Iraq.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the College of Veterinary Medicine Committee, University of Mosul, Iraq (12 decision number in 3-10-2021).

Study Area and Sample Collection

The current study was conducted with the Nineveh Governorate in northwestern Iraq. It shares borders with Syria and several Iraqi governorates. Nineveh is the third largest governorate in terms of size. Its total land area is estimated at 37,323 km² (8.6% the total size of Iraq). The prevailing climate in Nineveh is hot and dry in summers and cool and rainy in winter.

During October 2021 to January 2022, the blood samples were collected from 90 dogs of various breeds, including 45 stray dogs of local breeds and 45 police dogs, mostly of Belgian Malinois and German Shepherd breeds, with an age range of 1 to 11 years (median: 4.5 years). All dogs recently treated with antiparasitic drugs were excluded from the study.

Blood was obtained from cephalic vein and collected in EDTA and serum tubes at morning (between 9 a.m. to 12 noon). After allowing blood to clot, sera were separated by centrifugation and stored at -20 °C until analysis.

EDTA blood samples were analyzed for the presence of peripheral blood microfilariae using the wet mount, acridine orange stained blood smears by fluorescent microscope at 100 and 400 magnifications²², and modified Knott's test as described by²³, subsequently followed by microfilaria identification using key presented by Atkins (2005)²⁴.

For detection of the circulating antigen from the ovary of mature *D. immitis* female worms in amicrofilaremic dogs (diagnosis of an occult form of cardiac dirofilariasis), all sera were examined by a commercial antigen-enzyme-linked immune sorbent assay kit (heartworm Ag ELISA kit, canine, DRG International Inc., USA) according to manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Data obtained from the study were input and analyzed with the online statistical program (2-way contingency table analysis, In <http://statpages.org/ctab2x2.html>. Retrieved on 20/07/10). Cohen's kappa value (κ) was calculated to determine the compatibility between all tests (wet mount, acridine orange stained blood smears, and Ag ELISA) and modified Knott's test as a gold standard. The κ values were interpreted according to as the following: poor, $\kappa < 0$; light, $0 < \kappa < 0.20$; fair, $0.21 < \kappa < 0.40$; moderate, 0.41

$< \kappa < 0.60$; substantial, $0.61 < \kappa < 0.80$; and perfect, $0.81 < \kappa < 1.00$. The difference in the percentages of infection between the various animals were assessed by using chi square test. A *P* value $< .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 49 samples were microfilaria positive, giving a prevalence value of 54.4% (n=90, CI 40.4-61.8). *D. immitis* antigens were detected in 27.8% (N=90, CI 18.9-38.2) of the examined sera, with an overall prevalence of 78.9% (Table 1). The results showed that the prevalence of disease in dogs varies according to forms of diseases (Table 2). Stray dogs showed higher prevalence for both microfilaremic and occult forms of cardiac dirofilariasis compared with police dogs in Iraq's Nineveh Governorate (Table 3).

The agreement between the modified Knott's test (gold standard) and wet mount (Figure 1), acridine orange stained blood smears (Figure 2), and Ag ELISA using Cohen's κ index was light for wet mount (0.030) (Table 4) and substantial for Ag ELISA (0.462) (Table 1) and acridine orange stained blood smears (0.607) (Table 4).

Table 1. Overall canine cardiac dirofilariasis prevalence of 90 dogs in Iraq's Nineveh Governorate

Tests	Number of positive dogs/90 (%)	95% confidence interval	K value
Modified Knott's test	49(54.4)	40.4-61.8	Gold standard
Ag ELISA	25(27.8)	18.9-38.2	0.462
Total	71(78.9)	69.0-86.8	0.0

Table 2. Forms of canine cardiac dirofilariasis in dogs of Iraq's Nineveh Governorate

Forms of disease	Microfilaremic	Occult	Mixed
Numbers of infected animals/90(%)	46 (51.1)*	15 (16.7)	10 (11.1)
Chi square	23.632		33.414
Significance level	P = .0001		P < .0001

*Significant at P < .05

Table 3. The distribution of forms of canine cardiac dirofilariasis in both stray and police dogs of Iraq's Nineveh Governorate

Forms of disease	Type of dogs (N=90)		Chi square	Significance level
	Stray N/45 (%)	Police N/45 (%)		
Microfilaremic	31(68.9)*	15(33.3)	11.285	P = .0008
Occult	9 (20.0)	6 (13.3)	0.720	P = .3962
Mixed	8 (17.8)*	2 (4.4)	4.049	P = .0442
Total N/90(%)	48 (53.3)*	23 (25.6)	14.374	P = .0001



Figure 1. A wet blood smear may reveal *D. immitis* microfilariae in a dog with heartworm disease. Magnification $\times 100$ of the microscope with a phone (Infinix) camera from top

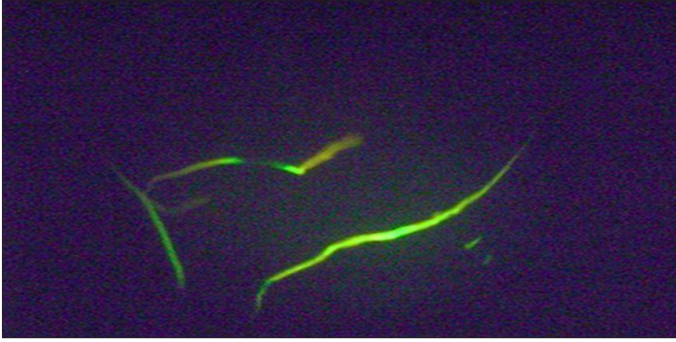


Figure 2. Microfilariiae of *D. immitis* stained with acridine orange stain. Magnification $\times 100$ of the fluorescent microscope with a phone (Infinix) camera from top.

Table 4. Comparison of κ value and the compatibility between modified Knott's test (gold standard) and wet mount and acridine orange stained blood smears in its ability to detect canine cardiac dirofilariosis

Test	Number of positive/90	%	95% confidence interval	κ value
Wet mount	3	3.3	-0.042-0.030	0.030
Acridine orange stained blood smears	25	27.8	0.473-0.637	0.607

DISCUSSION

D. immitis is a widespread zoonotic filarial nematodal infection in dogs. The present study is the first one in dogs of Iraq's Nineveh Governorate. Previously, *D. immitis* has been reported in cats of Mosul city, Iraq (the same area of the present study) ²⁵. Our examination shows that canine cardiac dirofilariosis was reported with higher percentage of infection (78.9%) in Iraq's Nineveh Governorate. Our results are in agreement with previous study from Karbala province by ²⁶, who used the necropsy method and reported 73 % as a rate of infection. Iraq is situated in the southwestern part of Asia and has a favorable climatic condition with high temperature and moisture that encourages the distribution and development of the mosquito vector of *D. immitis*. In addition, Iraq is home to large numbers of stray dogs and wild carnivores that are hosts of various parasites, including *D. immitis*, that are not given anthelmintic treatment²⁷. The prevalence of canine cardiac dirofilariosis appears to be increasing globally, mainly because of climate change and the mosquito population density, mosquito fertility, environmental temperature, number of microfilaremic dogs, and diagnostic test used ^{24; 28}. In contrast, canine cardiac dirofilariosis prevalence is declining in some regions, including Japan²⁹ and northern Italy, possibly because of increased awareness and enhanced control of the disease^{10; 30}. Higher positivity for both microfilaremic and occult forms of canine cardiac dirofilariosis was observed among stray dogs in our study. It is one of the main factors that explain the wide spread of the disease in dogs of Iraq's Nineveh Governorate. This may be attributed to stray dogs living in unhygienic outdoor conditions supporting mosquitoes, lack of preventive treatment, and the activities that presumably increase its vector exposure rates ³¹. The police dogs, when imported to Iraq, spent several weeks in different patrol tasks in the entrance of the cities. Moreover, *D. immitis* has colonized these areas because of the availability of many heartworm reservoirs (the stray dogs), suitable weather, and high density of mosquitoes as the intermediate vectors.

The agreement (Cohen's κ index) between the modified Knott's test (gold standard) was 0.607 and 0.462 for the acridine orange stained blood smears and Ag ELISA, respectively.

In this study, both tests diagnosed a high percentage of infected dogs (patent and occult disease).

The modified Knott's test is the most useful parasitological method among concentration tests, being based on the detection and identification of microfilariae in blood samples ^{32; 33; 34}. The results of the modified Knott's test may be impaired by occult infections. The antigen test (Ag ELISA) was accurate enough for diagnosis of a high percentage of infected animals (occult infection); we still could not identify all cases of heartworm infection because antigen tests will only be positive if adult female worms are present, because the antigen detected is from the worm's uterus. If the heartworms were not fully mature (prepatency), if there were only male worms present (unisex infection), if there was immune-mediated clearance of microfilariae, or if there was drug-induced sterility of adult filariae, the antigen test result in infected animals would be falsely negative. This means that the test result is negative when the animal is really infected³⁵. Ogbaje and Abel-Danjuma (2016)³⁶ confirmed modified Knott's test to be the most sensitive in the diagnosis of canine dirofilariosis in dogs using parasitological technique.

Ranjbar-Bahador et al. (2007)³⁷ showed that the sensitivity and specificity of antigen detection test kit were higher 92.85% and 96.87%, respectively, when compared with modified Knott's test at 85.71% and 91.60%, respectively.

CONCLUSION

The findings of the present study provide evidence for the prevalence and pattern of canine cardiac dirofilariosis in dogs (both stray and police) in Iraq's Nineveh Governorate, requiring a phylogenetic analysis.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the College of Veterinary Medicine Committee, University of Mosul , Iraq. (Approval No: 12, Date: 3-10-2021).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – M.I.A.F.; Design – M.I.A.F.; Supervision – M.I.A.F.; Resources – H.B.A.; Materials – M.I.A.F.; H.B.A.; Data Collection and/or Processing – M.I.A.F.; H.B.A.; Analysis and/or Interpretation – M.I.A.F.; H.B.A.; Literature Search – M.I.A.F.; H.B.A.; Writing Manuscript – M.I.A.F.; H.B.A.; Critical Review - M.I.A.F.; H.B.A.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Harran Üniversitesi'nden (Tarih: 5 Nisan 2017, No: 12541) alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – M.I.A.F.; Tasarım – M.I.A.F.; Denetleme – M.I.A.F.; Kaynaklar – H.B.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – M.I.A.F.; H.B.A.; Analiz ve/veya Yorum – M.I.A.F.; H.B.A.; Literatür Taraması – M.I.A.F.; H.B.A.; Yazıyı Yazan – M.I.A.F.; H.B.A.; Eleştirel İnceleme – M.I.A.F.; H.B.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

REFERENCES

- Atkins C. Overview of Heartworm Disease (Dirofilariasis), Review/Revision. The Merck Veterinary Manual. 2015. Available at www.merckvetmanual.com/mvm/.
- Beugnet F, Halos L, Guillot J. Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats. Rhein. Boehringer Ingelheim. 2018; 123-131.
- Adebayo OO, Akande FA, Adenubi OT. Canine Dirofilariasis: A case report and review of the literature. *Folia Veterinaria*. 2020; 64(3):75-81. [\[Crossref\]](#)
- Chalifoux L, Hunt RD. Histochemical differentiation of dirofilaria immitis and dipetalonema reconditum. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 1971;(5):601-605.
- Ortega-Mora L.M., Gómez-Bautista M., Rojo-Vázquez F.A. The acid phosphatase activity and morphological characteristics of *Dipetalonema dracunculooides* (Cobbold, 1870) microfilariae. *Vet. Parasitol*. 1989; 33:187-190. [\[Crossref\]](#)
- Toparlak M, Gargili A, Esatgil M, Cetinkaya H. Canine Filariosis Around Istanbul, Turkey Employing Naphtol AS-TR Phosphatase technique. *Acta Vet. Brno*. 2005;74(2):233-237. [\[Crossref\]](#)
- Ferreira C, Afonso A, Calado M. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):250. [\[Crossref\]](#)
- Hoch H, Strickland K. Canine and feline dirofilariasis: life cycle, pathophysiology, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet*. 2008;30(3):133-140; quiz 141.
- Henry LG, Brunson KJ, Walden HS, Wenzlow N, Beachboard SE, Barr K.L., Long M.T. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. *Vet. Parasitol*. 2018;254:178-182. [\[Crossref\]](#)
- Genchi M, Rinaldi L, Venco L, Cringoli G, Vismarra A, Kramer L. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: a questionnaire study in Italy. *Vet. Parasitol*. 2019;267:26-31. doi:10.1016/j.vetpar.2019.01.014. [\[Crossref\]](#)
- Anvari D, Elahe N, Ahmad D, Shahabeddin S, Mahmood M, Hezarjaribi Z, Reza M, Shirzad G. The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles. *Res Vet Sci*. 2020;131:104-116. doi:10.1016/j.rvsc.2020.04.002. [\[Crossref\]](#)
- Selim A, Alanazi D, Sazmand A, Otranto D. Seroprevalence and associated risk factors for vector-borne pathogens in dogs from Egypt Abdelfattah. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):175 <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04670-0>. [\[Crossref\]](#)
- Yildiz K, Yasa D, Yagci BB, Öcal N, Gazyağci AN. Distribution of dirofilaria immitis in dogs in Kırıkkale. *Turkish J Parasitol*. 2008;32:225-228.
- Sarı BM, Taşkın G, Kılıç Y. Seroprevalence of dirofilaria immitis, ehrlichia canis and borrelia burgdorferi in dogs in Iğdır province, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Journal*. 2013;19:735-739. [\[Crossref\]](#)
- Sarali H, Bilgic H, Bakirci S, Karagenc T. Prevalence of dirofilaria immitis infection in dogs from Aydın and Izmir Provinces, Turkey. *Animal Health Prod and Hyg*. 2020;9(2):711 - 715.
- Omar O, Elamin E, Omer S, Alagaili A, Mohammed O. Serorevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs and cats in Riyadh City, Saudi Arabia, *Trop Biomed*. 2018;35(2): 531-540.
- Bamorovat M, Sharifi I, Fasihi Harandi M, Nasibi S, Sadeghi B, Khedri J, Mohammadi MA. Parasitological, serological and molecular study of dirofilariaimmitis in domestic dogs, southeastern Iran. *Iran J Parasitol*. 2017;12:260-266.
- Amall HA. Seropidemiological study of heartworm *Dirofilaria immitis* in Baghdad and Karbala provinces. Thesis of PhD. In veterinary medicine \ Parasitology.College of Veterinary Medicine. University of Baghdad / Iraq. 2010.
- Al-Salihi KA, Al-Dabhawi AH, Al-Rammahi HM, Kareem FA. *Dirofilaria immitis* infestation in imported police (K-9) dogs in Iraq: clinicopathological and molecular investigations study. *Brazil J Vet Res Animal Sci*. 2019;56(2):e152987. [\[Crossref\]](#)
- Alia YY, May HK, Amall HA. Serological study of dirofilaria immitis in human from some village in Al-Hindya part of Karbala governorate. *Inter J Sci Natur*. 2013;4 (1):185-188.
- AL-shabbani A. In Iraq, The First Application of Serological SNAP ELISA Technique In Detection of Canine Heartworms (*Dirofilaria immitis*) In Herder Dogs of Al-Qadisiyah and Dhi-Qar Provinces. *Kufa J Vet Med Sci*. 2016;7(1):192-198.
- Gary WL, Leland SR, John H. CrossRapid Diagnosis of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* Filariasis by an Acridine orange/Microhematocrit Tube Technique. *The Journal of Parasit*. 1990;76(2): 278-281. Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3283035> . [\[Crossref\]](#)
- Rojas A, Rojas D, Montenegro VM, Baneth G. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasit Vectors*. 2015;8:170. [\[Crossref\]](#)
- Atkins C. Canine heartworm disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook Vet Internal Med*. 6th ed. St. Louis: Elsevier. 2005;1118-1136.
- Alobaidii W, Zaki Z, Hassan M. Detection of dirofilaria immitis antigen in cats in Mosul city. *Iraqi J Vet Sci*. 2022;36(1):57-60. [\[Crossref\]](#)
- Amall HA, Aleia YY. First document on the presence of Iraqi *Dirofilaria immitis*. *Iraqi J Vet Med*. 2009;33(1):183-186. [\[Crossref\]](#)
- Al Salihi KA, Al Zubaydi SQ, Katah, H. Gastrointestinal parasites infestation in military working dogs/ K9 in Al Muthanna Governorate in compare to semi housed dogs. *Mirror Res Vet Sci Anim*. 2017;6(2):25-38.
- Montarsi F, Ciochetta S, Devine G, Ravagnan S, Mutinelli F, Frangipane di Regalbono A, Otranto D, Capelli G. Development of *dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes (Finlaya) koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasit Vectors*. 2015;8:177. [\[Crossref\]](#)
- Oi M, Yoshikawa S, Ichikawa Y, Nakagaki K, Matsumoto J, Nogami S. Prevalence of *dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999-2001 and 2009-2011. *Parasite*. 2014;21(4):10. [\[Crossref\]](#)
- Mendoza-Roldan J, Benelli G, Panarese R, Iatta R, Furlanello T, Beugnet F, Zatelli A, Otranto D. leishmania infantum and dirofilaria immitis infections in Italy, 2009-2019: Changing distribution patterns. *Parasit Vectors*. 2020;13:193. [\[Crossref\]](#)
- Nguyen C, Koh WL, Casteriano, A. Mosquito-borne heartworm dirofilaria immitis in dogs from Australia. *Parasit Vectors*. 2016;9: 535. [\[Crossref\]](#)
- Coles EH. *Vet Clin Pathol*. 4th ed. Saunders Company, Philadelphia. 1986:203-240.
- Watanabe Y, Yang CH, Tung KC, Ooi HK. Comparison of microfilaria concentration method for *Setaria digitata* infection in cattle and for *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *J. Vet. Med. Sci*. 2004;66: 543-545. [\[Crossref\]](#)
- Venco L, Genchi, C, Simón F. La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. In *La Filariosis en las Especies Domésticas y en el Hombre*, Simón F, Genchi C, Venco L, Montoya MN, Eds.; Merial Laboratorios: Barcelona, Spain. 2011:19-60.
- Laidoudi Y, Ringot D, Watier-Grillot S, Davoust B, Mediannikov OA. Cardiac and subcutaneous canine dirofilariosis outbreak in a kennel in central France. *Parasite*. 2019;26:72. [\[Crossref\]](#)
- Ogbaje CI, Abel-Danjuma. Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Makurdi, Benue State, Nigeria. *J Adv Vet Anim Res*. 2016i,3(4): 338-344. [\[Crossref\]](#)
- Ranjbar-Bahadori S, Eslami A, Bokaic S. Evaluation of different methods for diagnosis of dirofilaria immitis. *Pak J Biol Sci*. 2007;10(11):1938-1940. [\[Crossref\]](#)