



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Cilt/Volume 31 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2020

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

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

Türkçe ve İngilizce / *Turkish and English*

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099

Sahibi / Owner

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına

On behalf of the Veterinary Control Central Research Institute

Dr. Cevdet Yaralı

Enstitü Müdür V. / *Director*

Yayın Kurulu / Publication Board

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor

Özcan Yıldırım

Editör / Editor in Chief

Dr. Erdem Danyer

Dr. Selçuk Pekkaya

Dil Editörleri / Copy Editors

Dr. Yeliz YIKILMAZ

Dr. F. İpek KESKİN

Bilimsel Kurul* / Editorial Board

Dr. Erhan Akçay

Dr. Özlem Altıntaş

Dr. Ali Erkurt

Dr. Sabri Hacıoğlu

Uzm. Yusuf Ziya Kaplan

Uzm. Bahadır Kılınç

Çağla Korkmaz

Doç. Dr. Burhan Toprak

Neslihan Akbulut Tosun

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

Danışma Kurulu / Advisory Board

Ertan AĞTÜRK, Foot and Mouth Disease Inst., Ankara, Turkey

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

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

Dr. Martin BACHMANN, Martin Luther Uni., Halle, Germany

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

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

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

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

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

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

Dr. Ufuk EROL, Cumhuriyet Uni., Sivas, Turkey

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

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

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

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

Dr. Günel İSMAİLOVA, Independent Consultant, Rome, Italy

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

Mehmet KARAKAYA, Foot and Mouth Disease, Ankara, Turkey

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

Dr. Emre OZAN, Ondokuz Mayıs Uni., Samsun, Turkey

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

Dr. Giulia RONCON, Utrecht Uni., Utrecht, The Netherlands

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

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

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

Dr. Özhan TÜRKİYILMAZ, Bornova Vet. Cont. Inst., İzmir, Turkey

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

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

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

Adres / Address : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A 06020
Etlik - Ankara / TÜRKİYE Tel. : +90 312 326 00 90 (8 hat) Faks : +90 312 321 17 55

E-posta : etlikdergi@tarimorman.gov.tr

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

Hakem Listesi* / Reviewer List

Doç. Dr. Zeki ARAS	Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Şükrü Hakan ATALGIN	Balıkesir Üniv. Veteriner Fakültesi Anatomi AD.
Dr. Öğretim Üyesi Orkun BABACAN	Balıkesir Üniv. Kepsut Meslek Yüksekokulu Veterinerlik Bölümü
Prof. Dr. İbrahim BALKAYA	Atatürk Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Prof. Dr. Mehmet BAŞALAN	Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hast. AD.
Dr. Öğretim Üyesi Nüvit COŞKUN	Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN	Bingöl Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD.
Prof. Dr. İlknur DAĞ	Eskişehir Osman Gazi Üniv. Merkezi Araştırma Lab. Uygulama ve Araştırma Merkezi
Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL	Gazi Üniv. Eczacılık Fakültesi
Doç. Dr. Esra DİLEK	Erzincan Binalı Yıldırım Üniv. Eczacılık Fakültesi Biyokimya AD.
Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ	Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji AD.
Dr. Ali ERKURT	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Biyokimya Laboratuvarı
Prof. Dr. Arzu FINDIK	Samsun Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji AD.
Dr. Öğretim Üyesi Tülin Güven GÖKMEN	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Öğretim Üyesi Erinc GÜMÜŞ	Aksaray Üniv. Eski Meslek Yüksekokulu
Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Prof. Dr. Sinan İNCE	Afyon Kocatepe Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji Toksikoloji AD.
Erol KABİL	Pendik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enst. Müdürlüğü Doping Kontrol Lab.
Dr. Burcu KARAGÜLLE	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI	Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD.
Doç. Dr. Akın KIRBAŞ	Bozok Üniv. Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar AD.
Doç. Dr. Gonca Ozan KOCAMÜFTÜOĞLU	Mehmet Akif Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD.
Doç. Dr. Lora KOENHEMSİ	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Dahiliye AD.
Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Biyokimya AD.
Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Ertan Emek ONUK	Samsun Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Su ürünleri Hastalıkları AD.
Dr. Öğretim Üyesi Çiğdem ÖTER	Van Yüzüncü Yıl Üniv. Fen Fakültesi Kimya Bölümü
Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR	Atatürk Üniv. Veteriner Fakültesi Anatomi AD.
Prof. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY	Adnan Menderes Üniv. Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
Doç. Dr. Şule SANAL	Samsun Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Vet. Hekimliği Tarihi ve Deontolojisi AD.
Dr. Ataman Bilge SARI	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Esra SATIR	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Anaerob Aşılı Üretim Merkezi
Doç. Dr. Zafer SAYIN	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Zehra SELÇUK	Samsun Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme Hast. AD.
Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Prof. Dr. Esra ŞEKER	Afyon Kocatepe Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Zeynep ŞIK	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bakteri Teşhis Laboratuvarı
Dr. Öğretim Üyesi Hidayet TUTUN	Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Kutay YILDIZ	Boğaziçi Üniv. Deneyisel Hayvan Üretim ve Bakım Birimi

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

ULAKBİM Yaşam Bilimleri, Türkiye Atıf Dizini, EBSCO, CAB Abstracts, Asos Index veritabanları kapsamında bulunan DergiPark'da açık erişim olarak yayın yapan, "en az çift hakemli" bir dergidir.

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

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2020, Her hakkı saklıdır. / All rights reserved.
Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2020, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Designed and Pressed by



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

İçindekiler / Contents

Original Article / Özgün Araştırma

An evaluation of the effects of medium pH on the viability of the HepG2 cell line

HepG2 hücre hattının canlılığı üzerine medium pH'sının etkisinin incelenmesi

Neşe Güvenalp, Dilek Güvenç 107

Changes in oxidative stress parameters in ear-tagged calves in acute period

Kulak küpesi takılan buzağılarda akut dönemde oksidatif stres değişimleri

Mustafa Cellat, Pınar Peker Akalın, Cafer Tayer İşler, Mehmet Güvenç, İshak Gökçek,

Filiz Kazak, Nuri Başpınar 115

The effect of iron on the expression of hemolysin/cytolysin and growth of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*Demirin *Vibrio vulnificus*'un klinik ve çevresel suşların büyümesi ve hemolizin/sitolizin ekspresyonu üzerine etkisi

Sedat Çam 121

Frequency of *Staphylococcus pseudintermedius* in canine skin infections and antibiotic resistance profiles of the recovered isolatesKöpek deri enfeksiyonlarında *Staphylococcus pseudintermedius* sıklığı ve elde edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri

İnci Başak Müştak, Hamit Kaan Müştak, Seyyide Sarıçam, Tuğçe Üstün, Asena Esra Erdem 127

Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle using MIRU-VNTR analysisSığırlardan izole edilen *Mycobacterium bovis* izolatlarının MIRU-VNTR analizi ile tiplendirilmesi

Yasin Gülcü, Hasan Hüseyin Hadimli 133

Gamitromisin ve Tulatromisinin sığır trakea düz kası üzerine etkileri

Effects of Gamithromycin and Tulathromycin on bovine tracheal smooth muscle

Yaşar Şahin, Ebru Yıldırım, Begüm Yurdakök Dikmen 140

İç Anadolu'da enfeksiyöz bronşit virüsü aşılmasının etkinliği

The efficacy of infectious bronchitis virus vaccination in Central Anatolia

Gülşen Goncagül, Özlem Kardoğan, Elçin Günaydın 147

Osmaniye yöresindeki köpeklerde Anti-*Neospora caninum* antikorlarının araştırılmasıInvestigation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in Osmaniye province

Armağan Erdem Ütük, Bünyamin Akın 154

Ankara Keçisinde (*Capra hircus*) dil papillalarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik yapısı üzerine incelemeler: I. Tat papillaları

Investigations on the light and scanning electron microscopic structure of the lingual papillae in the Angora Goat (*Capra hircus*): I. Gustatory papillae.

Burhan Toprak, Selami Candan, Nurcan Özyurt Koçakoğlu 158

Oleanolik asidin çekal ligasyon ve punksiyon ile sepsis oluşturulan ratlarda kalp hasarı üzerine etkileri

The effects of oleanolic acid on heart injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats

Hüseyin Serkan Erol, Tuba Aydın, Serkan Yıldırım, Mohammad Alhilal, Muhammet Bahaeddin Dörtbudak, Kübra Coşar, Mesut Bünyami Halıcı 167

Sığırlarda Trichophytosis'in teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliğinin araştırılması

Evaluation of usage ELISA for diagnosis in cattle Trichophytosis

Hülya Kaplan, Oktay Keskin 177

Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri ve Kırıkkale illerinde bulunan broiler işletmelerinin büyüklüğü ve hayvan besleme alışkanlıkları

The scales and feeding practices of broiler operations located at Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri and Kırıkkale provinces

Mustafa Coşar, M. Akif Karslı 184

Case Report/ Olgu Sunumu

Case report: Isolation of *Scopulariopsis brevicaulis* from Wistar Rats

Olgu sunumu: Wistar Ratlarından *Scopulariopsis brevicularis* izolasyonu

Özlem Şahan Yapıcıer, Mehmet Kaya, Zeki Erol, Dilek Öztürk 196

Review Article / Derleme

Veteriner tıbbi ürünlerde safsızlıklar

Impurities in veterinary medicinal products

Mustafa Kesmen, Tülay Bakırel 201

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

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

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

Başvuru sırasında sunulacak dosyalar:

a. Başlık sayfası:

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

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

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

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

Farelerde Papilla Filiformislerin Işık ve Taramalı Elektron Mikroskopik Yapısı

Burhan Toprak^{1,a,*}

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

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

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

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

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

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

b. Makalenin ana metini:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

19. Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelili Yayın:

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

Yazarlı Kitap:

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

Editörlü Kitap:

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

Editörlü Kitapta Bölüm:

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

Kongre Bildirileri:

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

Tezler:

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

Anonim:

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

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

20. Kaynakların sonuna mevcut ise doi numarası yazılmalıdır.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Yayın, Hakemleme, Etik İlkeleri ve Yasal Sorumluluklar

Bu dergi öncelikli olarak bakteriyoloji, parazitoloji, viroloji, halk sağlığı, epidemiyoloji, aşı üretimi, laboratuvar kalite yönetim sistemleri olmak üzere, diğer tüm veteriner bilim alanlarını kapsamaktadır. Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi araştırma ve yayın etiği standartlarına bağlıdır. İntihal tespit edilmesi kabulden sonra bile bir yazının reddedilmesine neden olabilir. Editörler, herhangi bir etik suistimal şüphesinde, ilgili uluslararası yayın ve araştırma etiği kurallarına (COPE guidelines, Cse White Paper on Publication Ethics, ORI) uygun olarak hareket eder. Dergimizde yayınlanması için gönderilen bilimsel çalışmaların European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Deneyisel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik hükümlerine uygun olarak yapıldığını, gerekli tüm kurumsal etik ve yasal izinlerin alındığını varsayarak, bu konuda dergi yönetimi olarak sorumluluk kabul etmemektedir. Çalışmada "Hayvan" ögesi kullanılmış ise yazarlar, yazının Gereç ve Yöntem bölümünde çalışmalarında hayvan haklarını koruduklarını ve ilgili etik ku-

ruldan onay aldıklarını belirtmek zorundadır. Dergimiz gönderilen bilimsel çalışmalarda European consensus-platform for alternatives stratejilerine uygun olarak deney hayvanlarının kullanımında 3R (Replacement, Reduction ve Refinement) kuralına uygun davranılmasını bekler ve destekler. Farklı etik kurul onayı ya da izin alması (Örneğin klinik araştırmalar etik kurul onayı gibi) değerlendirme süresince fark edilen yazıların değerlendirmesine ara verilerek gerekli izinleri alması için sorumlu yazar uyarılır, gerekli izinlerin tamamlanmasından sonra yayın sürecine devam edilir. Söz konusu onay bilgileri gereç ve yöntem kısmına eklenir. Çalışmalarla ilgili uluslararası ve ulusal düzenlemeler çerçevesince gerekli kurum ve kuruluşlardan alınması gereken tüm izinlerin (Örneğin yaban hayatına yönelik çalışma izin belgesi gibi) alınarak çalışmaya başlanması yazarların sorumluluğundadır. Dergi bu konuda sorumlu tutulamaz. Yazının sorumlu yazarı tarafından sistem aracılığıyla gönderilmesi ile yazının bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayınlanmadığı ve aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığı şeklinde değerlendirilir. Tüm yazarlar yayın içeriği ve hakkında hem fikir olduklarını beyan etmiş sayılırlar. Maddi destek ve çıkar ilişkisi durumu ayrıca başvuru sırasında editöre bildirilmelidir. Yazıların Türkçe ve İngilizce tam metinlerinin gönderilmesi ve yayına kabul edilmesi halinde tek bir yazı olarak kabul edilerek sırasıyla Türkçesi ve İngilizcesi yayınlanır. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu (etik, bilimsel, yasal, vb.) yazarlara aittir. Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazılar tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ile dergiye gönderilir.

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

Tarihçe ve Arşiv

1960-1976 yılları arasında Etik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi,

1977-1986 yılları arasında Etik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi,

1987 yılından günümüze kadar Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi adıyla yayınlanmıştır.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

Three files to be submitted during the Application

a. Title Page

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

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

5. After the first letter of names and all letters of surname of authors are written in capital letters, institutions and addresses of authors should be written via enumerating the names by superscripts. Names of cities and countries should be indicated in addresses. ORCID number submission is obligatory. ORCID numbers can be written after addresses with an indication of letters.

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

The Structure of Papilla Filliforms in Mice Under Light and Scanned Electron Microscope

Burhan Toprak^{1,a,*}

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

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

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

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

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

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

b. The main text of Article

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

8. In original scientific research, case reports and short reports should be prepared according to the following range. Turkish

and English titles, abstracts, at least five keywords, introduction, materials and methods, findings, discussion and conclusions and references.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

For articles:

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

For books:

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

For edited books:

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

For the chapter in edited books:

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

For congress papers:

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

For dissertations:

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

Anonymous:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Publication, Arbitration, Ethical Principles, and Legal Responsibilities

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

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

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

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

History and Archive

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

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

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

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi*

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen yazının;

Başlığı:

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

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

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

**Yazarlar yazıda belirtildiği gibi sıralanmalıdır.

Sorumlu Yazara ait telefon ve yazışma adresi:

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Copyright Release Form*

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

Title:

1. The manuscript is original and has not been submitted or considered for publication elsewhere, is not published elsewhere except in the form of abstract, and scientific and ethical responsibility belong(s) to me/us. In case all authors are not reached, all authors have been informed of the application and all authors have participated in the work process actively.

2. The work has been performed in consideration of ethical values and rules of the journal indicated in the publication rules; has been performed in a way not to offend any society, foundation or person and special care are shown to comply with ethical rules during animal testing. The owner of the journal, editor in chief, the editorial board are not responsible for the legal acts generated from the work and the manuscript.

3. In case of acceptance for publication of the manuscript, with the corrections considered necessary I/we hereby grant the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, without recourse, the right to publish, distribute, reproduce the manuscript according to your Journal's all printing and electronic printing rules reserving the other rights indicated in the publication rules.

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

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

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

Contact Number and Address of the Corresponding Author:



An evaluation of the effects of medium pH on the viability of the HepG2 cell line

Neşe Güvenalp¹ , Dilek Güvenç^{2*}

^{1,2} University of Ondokuz Mayıs, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Samsun Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 25.05.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 10.07.2020

Abstract: Cancer cells are characterized by increased glucose uptake and the production of lactate, which leads to acidification of the tumor microenvironment. This acidification facilitates the development of invasiveness and metastasis. In this study, we investigated the effects of medium pH manipulation on the proliferation and viability of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells *in vitro*. HepG2 cells were grown in media with pH ranging from 6.0 to 8.5 for 24 h. The cells were then subjected to WST-1 and trypan blue exclusion assays to evaluate viability and cell proliferation, respectively. At pH 6.8 and 6.6, HepG2 cell viability was not significantly different from the control group (pH 7.2) ($p>0.05$) but there was a significant decrease at pH 6.4, 6.2 and 6.0 ($p<0.05$). Furthermore, there was a significant decrease in cell viability at pH's 7.8, 8.0 and 8.5 ($p<0.05$). Cell numbers decreased at pH 6.8 and increased at pH 6.6, although not significantly ($p>0.05$), and decreased at pH 7.6 and 7.8 (significant at pH 7.8; $p<0.05$). In acidic environments, the cells were spindle-shaped and formed islands but they became more spherical and had reduced adhesion capacity in alkaline media. In this study, an alkaline environment reduced the proliferation and viability of the cell line, HepG2. Therefore, after further investigations, in addition to current treatments, systemic alkalization that appropriately increases the pH of the tumor microenvironment may suppress the activity of tumor cells and increase the efficacy of normal HCC treatment.

Keywords: Alkali medium; HepG2; microenvironment; proliferation; Warburg effect

HepG2 hücre hattının canlılığı üzerine medium pH'sının etkisinin incelenmesi

Özet: Kanser hücreleri, tümör mikroçevresinin asitleşmesine neden olan artmış glikoz alımı ve laktat üretimi ile karakterizedir. Asidik mikro-çevre kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz gelişimini kolaylaştırır. Bu çalışmada medium pH değişiminin, *in vitro* insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinin proliferasyon ve canlılığına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HepG2 hücreleri pH değeri 6.0 ile 8.5 arasında değişen medium ortamlarında 24 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücre canlılığı ve proliferasyon değerlendirmeleri için sırasıyla WST-1 ve tripan mavisi hücre canlılık testleri uygulandı. HepG2 hücre canlılığında, medium pH'sı 6.6 ve 6.8 olan gruplar ile kontrol grubu (pH 7.2) karşılaştırıldığında önemli bir farkın bulunmadığı ($p>0.05$), ancak pH 6.4, 6.2, 6.0'da önemli oranda azalmanın olduğu saptandı ($p<0.05$). Ayrıca alkali gruplardan pH 7.8, pH 8.0 ve pH 8.5'te hücre canlılık oranında belirgin bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Hücre sayısında pH 6.8'de artış ve pH 6.6'da azalmanın olduğu ancak istatistiksel olarak önemli fark olmadığı ($p>0.05$), pH 7.6 ve 7.8'de azalmanın bulunduğu ve bu azalmanın pH 7.8'de önemli olduğu saptandı ($p<0.05$). Asidik ortamlarda, iğ şeklindeki hücrelerin adalar oluşturduğu, alkali ortamda ise yapışma kapasiteleri azalmış hücrelerin yuvarlak şekilde olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada, alkali mikro-çevrenin HepG2 hücre hattının canlılığını ve proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, daha ileri araştırmalardan sonra mevcut tedavi yöntemlerine ek olarak tümör mikro-çevre pH'sını uygun bir şekilde yükselten sistemik alkalizasyonun, tümör hücrelerinin aktivitesini baskılayabileceği ve normal HCC tedavisinin etkinliğini artırabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Alkali ortam; HepG2; mikro-çevre; proliferasyon; Warburg etkisi

Introduction

Cancer, which is defined by abnormal cell growth that leads to an imbalance between cell proliferation and cell death as a consequence of multiple changes in gene expression (Ruddon, 2007), is one of the most common causes of death worldwide (Torre et al. 2016). The International Agency for Research on Cancer (IARC) reported that 18.1 million people were

diagnosed with cancer in 2018, and of that number, 9.6 million died (Bray et al. 2018). Hepatocellular carcinoma (HCC), which originates from liver cells called hepatocytes, is the most common, primary malignant tumor of the liver (Rodríguez-Hernández et al. 2018).

The metabolism of cancer cells is particularly oriented to survival and proliferation. One of the

most important changes is in energy metabolism (Hsu and Sabatini 2008). Many cancer cells convert glucose to lactate, although less energy is gained than through aerobic breakdown. Otto Warburg, in the 1920s, was the first person to report the occurrence of this metabolic process, even in the presence of sufficient oxygen. This phenomenon later became known as the "Warburg Effect" (Gatenby and Gillies 2004; Kato et al. 2013; Tian et al. 2019). Many studies have demonstrated that the pH of the extracellular fluids of cancer cells is acidic because of the Warburg Effect (Schwartz et al. 2017). The pH of the extracellular environment of tumor cells is generally 0.3 to 0.7 pH units lower than that of normal cells (Hao et al. 2018). While the extracellular pH of tumors ranges from 6.5 to 6.9, normal extracellular pH is between 7.2 and 7.5. An acidic microenvironment is a characteristic feature of the environment of cancer cells, such as HCC (Zhang et al. 2010; Chen et al. 2017). Moreover, the extracellular pH of malignant melanoma tissue is approximately 6.7 whereas the extracellular pH of normal skin tissue cells is approximately 7.3. Similarly, the extracellular pH of uterine cancer cells (6.9) is more acidic than normal uterine cells (7.6) (Hao et al. 2018).

The two main reasons why the pH of the microenvironment of cancer cells is acidic are the increased expression and activity of carbonic anhydrases and proton carriers which transport lactate and CO₂ to the outside of the cell, and the accumulation of CO₂ and lactate there due to poor perfusion (Zhang et al. 2010; Chen et al. 2017). Many recent studies have shown that the Warburg effect enhances the probability of: survival of tumor cells DeBerardinis et al. (2008); Lodish et al. (2016); Tuccitto (2018) tumor progression, metastasis and angiogenesis Chen et al. (2017); Zhang et al. (2017), suppression of the immune response in the tumor microenvironment Alfarouk et al. (2015), and resistance to the drugs administered during chemotherapy (Raghunand and Gillies 2000; Chen et al. 2017; Zhang et al. 2017).

Therefore, therapeutic interventions that target the acidity of the tumor microenvironment are being employed (Neri and Supuran 2011). For example, systemic alkalizers and alkalizing agents such as sodium bicarbonate have been successfully used to suppress the cell growth and metastasis of the human breast cell lines, MCF-7 and MDA-MB-321, and the human colon cancer cell line, HCT116, by increasing the extracellular pH (Robey et al. 2009; Silva et al. 2009; Ibrahim-Hashim et al. 2012; Estrella et al. 2013). Moreover, oral sodium bicarbonate treatment was reported to reduce the extent of metastasis

of breast and prostate cancer in immune system-deficient mice (Robey et al. 2009). In addition, in a clinical study involving patients with small cell lung cancer, an alkaline diet administered in combination with EGFR inhibitors increased the average survival time from 18.6 months to 28.5 months (Hamaguchi et al. 2017). Moreover, the radiation-induced death rate of human colorectal cancer cells (RKO.C) is lower at a more acidic pH than at the normal pH (Park et al. 2000, 2003). Although the relationship between cancer and the Warburg Effect has been the subject of a substantial amount of research over the past decade, to the knowledge of the authors of the present study, the effects of changes in the pH of the medium on the proliferation and viability of the human hepatocellular carcinoma cell line, HepG2, have not been investigated. Therefore, in this study, we evaluated the effects of both acidification and alkalization of the tumor microenvironment on the proliferation and viability of HepG2 cells and, indirectly, tumor progression.

Materials and Methods

Chemicals and Medium: The sodium bicarbonate, hydrochloric acid, trypan blue, Minimum Essential Medium (MEM), L-glutamine, penicillin-streptomycin and sodium pyruvate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). The WST-1 cell proliferation assay reagent was purchased from Roche (Basel, Switzerland), the essential amino acid was purchased from GIBCO (Grand Island, NY, USA), and the trypsin-EDTA was purchased from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel).

Cell culture: The human hepatocellular carcinoma HepG2 cells were provided by the American Type Culture Collection (ATCC, HB-8065, USA). The cell culture medium consisted of MEM supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin), 1% sodium pyruvate, 1% Non-Essential Acid (NEAA) and 2.2% g/l sodium bicarbonate. The frozen vials of cells were stored in a freezer at -80°C (Nüve-DF 490) until the experiment was conducted, at which time they were thawed by immersing the vial in a shaking water-bath (Nüve-Nb 20) at 37 °C. After thawing, the vial was disinfected with 70% isopropanol. The cells were then transferred into a sterile 75 cm² tissue cell culture flask containing 20 ml of MEM (supplemented with 20% FBS) and incubated at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (Nüve-EC 160) until they reached 75-80% confluence. During the incubation process, the culture medium was re-

placed with fresh medium every second day. When the cells reached approximately 80% confluence, they were removed from the flasks by trypsinization with 0.25 trypsin-EDTA and then sub-cultured. Later, the number of viable cells was counted by using 0.4 % trypan blue (Sigma, St Louis, MO, USA) staining and a Bio-Rad TC10™ automatic cell counter. After counting, the cell suspension was diluted with the same medium (containing 10% FBS) to 10^8 cells per 75 cm^2 flask before seeding. Then, all the cells were maintained in a humidified incubator containing 5% CO_2 at 37°C for 72 h. All of the preceding procedures were carried out under a sterile laminar flow hood.

Cell Viability Assays: The WST-1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) assay and trypan blue dye exclusion method were used to evaluate the inhibitory effects of different pH environments on HepG2 cells.

WST-1 assay: Cell viability was measured spectrophotometrically with WST-1, a cell proliferation reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,

Germany), according to the manufacturer's recommendations. For this purpose, HepG2 cells were transferred to a 96-well culture plate at a density of 3×10^4 cells per well and incubated for 24 h at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere. Twenty-four hours later the medium in each well was replaced with a medium adjusted with HCl or NaOH to one of 11 different pH levels ranging from pH 6 to 8.5. The cells in all wells were then incubated under the same conditions for 24 h. After 24 h, 10 μL of WST-1 was added to each well. The contents of the wells were then mixed for two minutes in an orbital shaker (Wise-Stir-MSH-20A). Following that procedure, the plates were incubated in a 5 % CO_2 atmosphere at 37°C for 30 min. Each experiment described here was performed in triplicate. In the final step, to calculate cell viability, the absorbance was measured at a test wavelength of 450 nm and a reference wavelength of 620 nm by using a microplate reader spectrophotometer (Tecan, software Magellan, Switzerland). All experiments were performed in triplicate.

The inhibitory effects of the cellular microenvironment were evaluated according to the formula of Yin et al. (2018), as follows:

$$\text{Proliferation rate} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \quad \text{And percentage viability} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

(A_{test}: absorbance values of test group, A_{control}: absorbance values of control group (medium at pH 7.2), A_{blank}: absorbance value of blank sample)

Trypan blue exclusion assay: The trypan blue test was applied according to the manufacturer's instructions. In brief, 3×10^5 cells were inoculated into each well of a 6-well plate and incubated for 24 at 37°C under an atmosphere containing 5% CO_2 . After 24 h of growth, the culture medium was removed and replaced with the test medium. For the trypan blue exclusion assay, the culture medium was removed from each well after 24 h. The cells were then washed with 1 ml trypsin-EDTA, after which 750 μL trypsin was added per well to remove the cells. The removed cells were then re-suspended in 750 μL of culture medium. The cell suspensions were then diluted 1:1 (v:v) with 0.4% trypan blue and then a 20 μL mixture was transferred to a cell count slide (Bio-Rad 145-0011). Cell counting was performed with an automated cell counter (Bio-Rad TC20 Hercules, CA, USA). All experiments were performed in triplicate.

External cell morphology determination: Cells were seeded into 6-well plates at a seeding density of 3×10^5 cells per well in cell growth medium at pH 7.2, and then allowed to acclimate for 24 hrs. The

medium was then replaced with a medium at pH 6.6, 6.8, 7.6, or 7.8. The morphological examination of the cells was carried out under a phase contrast inverted microscope (Zeiss-Vert.A1, Oberkochen, Germany) after the 24-hour incubation period.

Statistical analysis: The statistical analyses were performed using SPSS v 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The logarithmic transformation of cell counts for trypan blue test results was performed (with logarithms base 10). The data were tested with the Shapiro Wilk test for normality. Since the data were normally distributed, the means were analyzed with the one-way analysis of variance test (ANOVA), with post hoc Tukey's and Dunnett's tests applied. All data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD), and $p < 0.05$ was applied as the level of statistical significance. All experiments were replicated at least three times.

Results

WST-1 Cell Viability Assay: The WST-1 method was used to determine the inhibitory effects of pH on

the viability of HepG2 cells. The percentage of viable cells in the medium with pH 7.0 (101.52%) was very similar to that observed for the control group pH 7.2 (100%). However, the inhibitory effects of the media at pH 6.4, 6.2, and 6.0 were significantly higher than the control group ($p < 0.05$). In the more alkaline section of the pH spectrum, at pH 7.4 the cell viability increased significantly in comparison to the control group ($p < 0.05$), at pH 7.6 there was no difference ($p > 0.05$), and at pH's 7.8, 8.0 and 8.5, there was a significant decrease in cell viability ($p < 0.05$) (Figure 1). Based on the cell viability results, media at four different pH levels were selected for the trypan blue test for confirmation of the WST-1 test results and to examine cell morphology.

Trypan blue exclusion assay: The inhibitory effects of culture media at pH 6.6, 6.8, 7.6, and 7.8 on the proliferation of HepG2 cells was assessed with a trypan blue exclusion assay and the results are shown in Table 1.

The number of live cells decreased at pH 6.8 but increased at pH 6.6 in comparison to the control group, although neither difference was significant ($p > 0.05$). When these results were compared with results from the WST-1 assay, cell viability at pH 6.6 (102.88%) was also higher than at 6.8 (99.71%). In addition, the numbers of live HepG2 cells decreased at both pH 7.6 and pH 7.8, but only at pH 7.8 was the difference significant ($p < 0.05$), with cell viabilities of approximately 95% and 65% at pH 7.6 and 7.8, respectively (Figure 1).

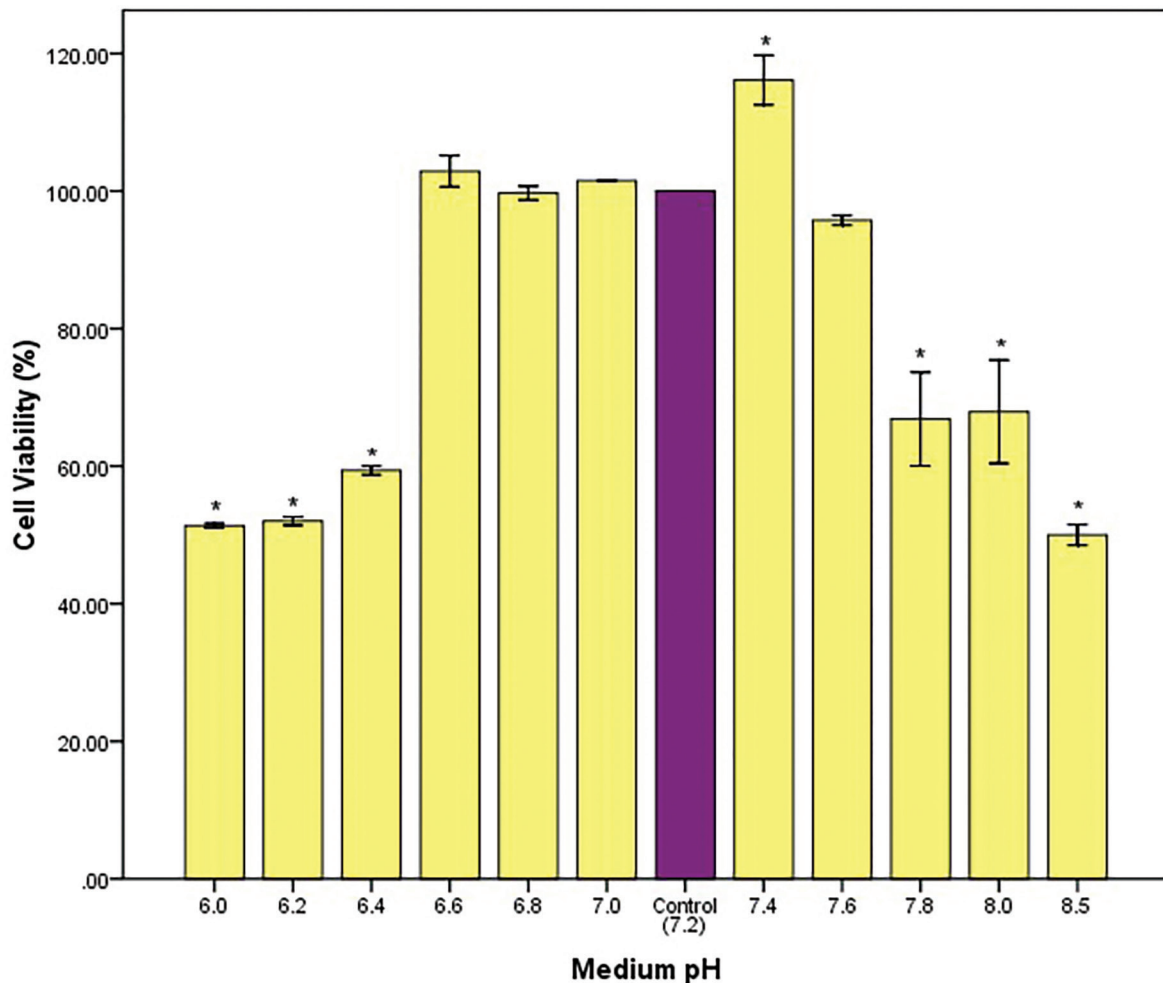


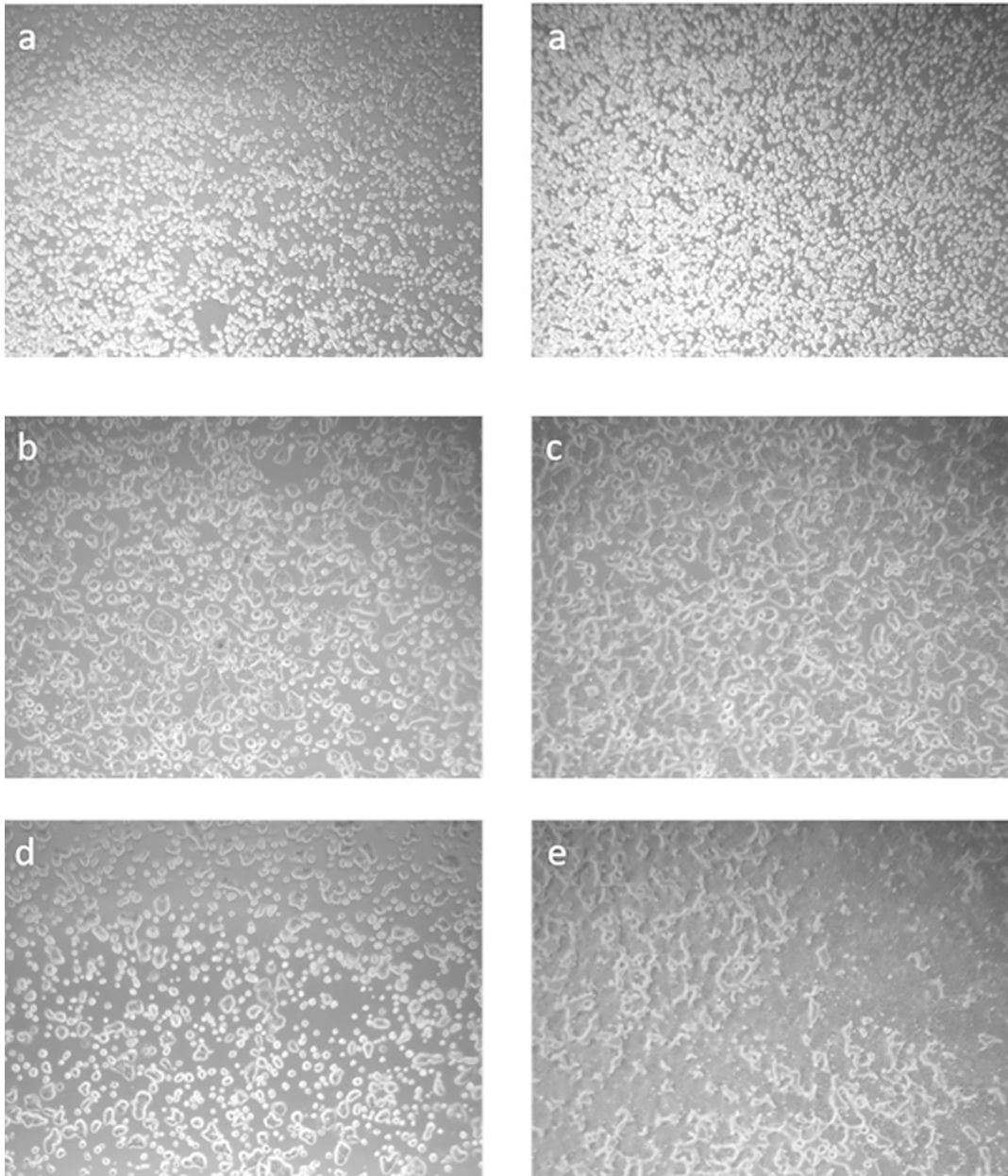
Figure 1. Effects of alteration of the pH level of the culture medium on the viability of HepG2 cells. Data are expressed as mean $\pm$ SE; *indicates that the mean for the pH is significantly different from the control pH (7.2) ($p < 0.05$).

Table 1. HepG2 cell proliferation in culture media at different pH values.

pH	Number of Live Cells/mm ³ (logarithms base 10) (Mean $\pm$ SD)
6.6	6.29 $\pm$ 0.025 ^a
6.8	6.25 $\pm$ 0.016 ^{a,b}
Control (7.2)	6.27 $\pm$ 0.015 ^{a,b}
7.6	6.19 $\pm$ 0.024 ^b
7.8	6.02 $\pm$ 0.061 ^c

^{a,b,c} The mean number of live cells in the media marked with different superscripts is significantly different ($p < 0.05$)

Characterization of the morphology of HepG2 cells cultured in media of different pH: At pH 6.2 and 6.8, the spindle-shaped HepG2 cells formed large islands but at pH 7.6 they formed small patches of round cells. In addition, HepG2 cells grown in the more alkaline pH 7.8 environment were also spherical but had lost their capacity to adhesion (Figure 2).

**Figure 2.** Microscope images at 80 $\times$ magnification of HepG2 cells cultured at pHs ranging from 6.6 to 7.8 pH for 24 hrs in a 6-well plate: (a) pH 7.2 (control group), (b) pH 6.6, (c) pH 6.8, (d) pH 7.6, (e) pH 7.8.

Discussion

The Warburg Effect (aerobic glycolysis) is a typical characteristic of cancer cells in that they exhibit abnormal metabolism due to an increase in the rate of glucose uptake and the production of lactate, even in the presence of oxygen, and is considered a distinctive feature of cancers (Silva et al. 2009). The metabolic consequences of this phenomenon are low glucose concentration, high lactate concentration, and lower extracellular pH in the tumor microenvironment. Lower extracellular pH and a hypoxic environment facilitate tumor growth and development and induce metastasis and invasion via multiple pathways. These pathways include point mutation, gene amplifications, inactivation of metastasis suppressor genes resulting from deletions, genomic instability, and overexpression by the genes involved (Rofstad et al. 2006; Swietach et al. 2007). In the clinical environment, the acidic tumor microenvironment reduces the anti-tumor immune response, the effectiveness of chemotherapy and radiotherapy, and ultimately the survival rate after surgical intervention. The tumor microenvironment and metabolic pathways inducing this microenvironment, which are fundamental to the cancer prognosis, mean that *in vivo* and *in vitro* studies on that microenvironment are gaining importance (Lacroix et al. 2018). Approaches that target this acidity, such as the direct neutralization of the acidic microenvironment, the development of acid-activatable drugs and nanoparticles, and the targeting of the metabolic pathways of tumor cells, have been reported (Pillai et al. 2019).

In the present study, the effects of manipulation of the normal acidic environment of HepG2 cells on their viability and proliferation were investigated. In the trypan blue exclusion assay, the number of live cells decreased at pH 6.8 and increased at pH 6.6 in comparison to the control group (pH 7.2), but the differences were not significant ($p > 0.05$). Separately, the WST-1 test showed that cell viability in the range from pH 7.0 to 6.6 was close to or higher than in the control group, but the number of viable cells significantly decreased ($p < 0.05$) at pH 6.4 and lower, with the proportion of live cells at approximately 60% or lower (Fig. 1, Table 1). It has been reported that the *in vivo* extracellular pH of many tumors ranges from 6.6 to 7.0 (Hao et al. 2018). The results of the WST-1 test in the present study are supportive of these data.

Extracellular acidity leads to a more malignant cell phenotype, the activity of which is mediated by

signal proteins, transcription factors, cytokines, invasion-related receptors, and the modulation of the hundreds of genes that stimulate cell proliferation in the early stages of tumor progression (Rofstad et al. 2006; Moellering et al. 2008; Fukamachi et al. 2013). In this study, the metastatic activity and invasiveness of HepG2 cells cultured at pH 6.6 were likely increased by the inactivation of the tumor suppressing cell adhesion molecule, E-cadherine, as reported by Chen et al. (2009). Separately, when HS27 fibroblast cells were cultured in a high lactate (acidic) environment, the level of hyaluronan, which is responsible for rapid tissue growth, increased (Stern et al. 2002). Rofstad et al. (2006) reported that the melanoma cell lines, A-07, D-12 and T-22, when cultured in acidic media, and then injected into mice, increased pulmonary metastasis due to the overexpression of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), and cathepsin B and L, which are proteolytic enzymes.

In a holistic sense, the biology of cancers can be seen as the product of an evolutionary and ecological process. All tumor cell phenotypes potentially provide an evolutionary advantage that supports cell proliferation, especially increased glucose metabolism and, consequently, interstitial acidosis. Moreover, local acidosis, which is widely observed in nature, is seen as "niche engineering", a phenomenon by which plants and animals change their environment and consequently gain a competitive advantage that helps ensure their growth and survival (Gatenby et al. 2006; Gatenby and Gillies 2008). Based on the results of our study, the increased proliferation rate of HepG2 cells in acidic environments may be interpreted as the first step of "niche engineering".

In the current study, the proliferation and viability of HepG2 cells in media at pH 6.6, 6.8, and 7.0 did not differ significantly from the control (pH 7.2) ($p > 0.05$), which provides indirect support for earlier reports that tumors generally have an acidic extracellular environment that, by inference, is supportive of their growth (Zhang et al. 2010; Chen et al. 2017; Hao et al. 2018). The present study also showed that the proportion of viable HepG2 cells was lower when they were cultured in alkali media, except at pH 7.4, and significantly lower at pHs of 7.8 and higher ($p < 0.05$). The significant decrease in both cell viability and proliferation at pH 7.8 (Fig 1, Table 1) in comparison to the control group appears to be a key finding of the present study. These findings could support to create and maintain an alkaline microenvironment around tumor cells in

patients that would make a meaningful difference to their treatment outcomes.

Other evidence for the potential benefits of treatment with alkalization was provided by Trivedi et al. (2018) who reported that increasingly alkaline pH reduced the viability of the breast cancer cell line, MDA-MB-231. In addition, an extract from the neem tree, *Azadirachta indica*, in combination with alkaline pH treatment, caused a dose-dependent decrease in cell viability *in vitro*. Moreover, several recent preclinical and clinical studies have reported that tumor behavior was altered by the administration of sodium bicarbonate orally or other alkali diet treatment. Also, in a modeling study, orally administered bicarbonate therapy reduced the incidence of metastasis in breast and prostate cancer in immunity-deficient mice (Robey et al. 2009). In another study, patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and epidermal growth factor (EGFR) mutation were treated with an alkaline diet, in addition to the low-dose EGFR inhibitors, gefitinib, erlotinib, and afatinib, at the standard treatment doses. Patients were followed-up long-term and their survival was prolonged in comparison to patient populations receiving the standard treatment. The researchers stated that their results with advanced lung cancer patients constituted clinical evidence that there may be positive outcomes related to this treatment (Hamaguchi et al. 2017). In contrast, the activity of cytokine-induced killer cell's antitumor activity against HepG2 cells was reduced in a medium at pH 6.5 (Izumi et al. 2003). In addition, the intracellular accumulation of various lipophilic anticancer agents has been shown to be controlled by the cellular pH gradient. Therefore, studies on pH sensitive nanoparticles are being conducted for selective cancer chemotherapy (Feng et al. 2017; Xia et al. 2018).

Conclusion

An acidic tumor microenvironment can change the behavior of tumor cells and manifest as proliferation, invasion, and metastasis, and also reduce the immune system response to the tumor and the success of chemotherapy. The present study demonstrated that an alkaline medium can significantly reduce the proliferation and viability of HepG2 cancer cells *in vitro*. Therefore, in addition to the existing treatment strategies, the appropriate alkalization of the microenvironment of tumor cells may increase the probability of successful treatment. To further that objective, preclinical and clinical studies should be conducted into changes in the activity of recep-

tors, signal proteins, transcription factors, cytokines, and cell cycle control genes resulting from the alkalization of the tumor microenvironment.

Acknowledgement: This study was summarized from the master thesis of the first author. The authors thank Dr. Gregory T. Sullivan for proofreading an earlier version of this manuscript.

Financial Support: This study was supported by Ondokuz Mayıs University Research Foundation (Project No PYO.VET.1904.19.001)

Reference

- Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, Bashir AH, Mohammed OY, Elhassan GO, Harguindey S, Reshkin SJ, Ibrahim ME, Rauchet C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int.* 15,71 DOI: 10.1186/s12935-015-0221-1.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424 DOI: 10.3322/caac.21492.
- Chen M, Chen C, Shen Z, Zhang X, Chen Y, Lin F, Ma X, Zhuang C, Mao Y, Gan H, Chen P, Zong X, Wu R. (2017). Extracellular pH is a biomarker enabling detection of breast cancer and liver cancer using CEST MRI. *Oncotarget.* 8, 45759- 45767 DOI: 10.18632/oncotarget.17404.
- Chen Y, Chen CH, Tung PY, Huang SH, Wang SM. (2009). An acidic extracellular pH disrupts adherens junctions in HepG2 cells by Src kinases-dependent modification of E-cadherin. *J Cell Biochem*,851-859
- DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* 18, 54-61 DOI: 10.1016/j.gde.2008.02.003
- Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ et al. (2013). Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* 73, 1524-1535 DOI: 10.1016/j.gde.2008.02.003
- Feng Q, Shen Y, Fu Y, Muroski ME, Zhang P, Wang Q, Xu C, Lesniak MS, Li G, Cheng Y.(2017). Self-assembly of gold nanoparticles shows microenvironment-mediated dynamic switching and enhanced brain tumor targeting. *Theranostics*, 1875-1889 DOI: 10.7150/thno.18985.
- Fukamachi T, Ikeda S, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. (2013). Gene expressions for signal transduction under acidic conditions. *Genes* , 65-85
- Gatenby RA, Gillies RJ. (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 56-61
- Gatenby RA, Gillies RJ.(2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899
- Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ.(2006). Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res*, 5216-5223
- Hamaguchi R, Okamoto T, Sato M, Hasegawa M, Wada H. (2017). Effects of an alkaline diet on EGFR-TKI therapy in EGFR mutation-positive NSCLC. *Anticancer Res*, 37, 5141-5145

- Hao G , Xu ZP, Li L. (2018). Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy. *RSC Adv.* 8, 22182-22192
- Hsu PP, Sabatini DM. (2018). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707
- Ibrahim-Hashim A, Cornell HH, Abrahams D, Lloyd M, Bui M, Gillies RJ, Gatenby RA. (2012). Systemic buffers inhibit carcinogenesis in TRAMP mice. *J Urol*, 188, 624-631
- Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, 541-549
- Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int*, 13, 89
- Lacroix R, Rozeman EA, Kreutz M, Renner K, Blank CU. (2018). Targeting tumor-associated acidity in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 67, 1331-1348
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Paul M. (2016) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, 5th edition, New York
- Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, Gatenby RA, Gillies RJ. (2008). Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis*, 411-425
- Neri D, Supuran CT. (2011). Interfering with pH regulation in tumors as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 10, 767-777
- Park H, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. (2000). Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment. *Cell Death Differ.* 7, 729-738
- Park HJ, Lee SH, Chung H, Rhee YH, Lim BU, Ha SW, Griffin RJ, Lee HS, Song CW, Choiet EK. (2003). Influence of environmental pH on G2-phase arrest caused by ionizing radiation. *Radiat Res.* 159, 86-93 DOI: 10.1667/0033-7587(2003)159[0086:ioepog]2.0.co;2.
- Pillai SR, Damaghi M, Marunaka Y, Spugnini EP, Fais S, Gillies RJ. (2019). Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 205-222 DOI: 10.1007/s10555-019-09792-7.
- Raghunand N, Gillies RJ. (2000). pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat*, 3, 39-47
- Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Dosescu J, Sloane BF, Ibrahim Hashim A, Morse DL, Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. (2009). Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res.* 69, 2260-2268 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5575.
- Rodríguez-Hernández MA, González R, de la Rosa AJ, Mauriz JL, Padillo FJ, Muntane J. (2018). Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by Sorafenib in liver cancer cells: In vitro and in vivo studies. *J Hepatol* 68, 670-671 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(18\)31599-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)31599-X)
- Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. (2006). Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 66, 6699-6707 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0983.
- Ruddon RW. (2007). Characteristics of Human Cancer. In: *Cancer Biology*, 4th Edition. Oxford University Press Inc, New York. p. 3-16
- Schwartz L, Seyfried T, Alfaro KO, Moreira JV, Fais S. (2017). Out of Warburg effect: an effective cancer treatment targeting the tumor specific metabolism and dysregulated pH. *Semin Cancer Biol*, 43, 134-138 DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.01.005.
- Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Gatenby RA. (2009). The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res.* 69, 2677-2684 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2394
- Stern R, Shuster S, Neudecker B, Formby B. (2002). Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res*, 24-31.
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 299-310
- Tian XP, Wang CY, Jin XH, Li M, Wang FW, Huang WJ, Yun JP, Xu RH, Cai QQ, Xie D. (2019) Acidic Microenvironment Up-Regulates Exosomal miR-21 and miR-10b in Early-Stage Hepatocellular Carcinoma to Promote Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Theranostics.* 9, 1965-1979
- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25, 16-27 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
- Trivedi A, Ahmad R, Misra A. (2018). Effect of alkaline pH on cytotoxicity profile of neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extract against human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Eur J Integr Med*, 1-7
- Tuccitto A. (2018). pH regulatory molecules in the tumour microenvironment: modulators of aggressiveness and immune profile of human hepatocellular carcinoma. The Open University, Faculty of Science Technology Engineering and Mathematics (STEM), PhD thesis, Milton Keynes (UK)
- Xia F, Hou W, Zhang C, Zhi X, Cheng J, Fuente JM, Song J, Cui D. (2018). pH-responsive gold nanoclusters-based nanoprobe for lung cancer targeted near-infrared fluorescence imaging and chemo-photodynamic therapy. *Acta Biomater*, 308-319 DOI: 10.1016/j.actbio.2017.12.034.
- Yin P, Yang L, Xue Q, Yu M, Yao F, Sun L, Liu Y. (2018). Identification and inhibitory activities of ellagic acid- and kaempferol-derivatives from Mongolian oak cups against α -glucosidase, α -amylase and protein glycation linked to type II diabetes and its complications and their influence on HepG2 cells' viability. *Arab J Chem*, 11, 1247-1259
- Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. (2010). Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med.* 51, 1167-1170, DOI: 10.2967/jnumed.109.068981.
- Zhang Y, Zhang T, Wu C, Xia Q, Xu D. (2017). ASIC1a mediates the drug resistance of human hepatocellular carcinoma via the Ca²⁺/PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Lab Invest.* 97, 53-69 DOI: 10.1038/labinvest.2016.127



Changes in oxidative stress parameters in ear-tagged calves in acute period

Mustafa Cellat¹ , Pınar Peker Akalın^{2*} , Cafer Tayer İşler³ , Mehmet Güvenç⁴ , İshak Gökçek⁵ ,
Filiz Kazak⁶ , Nuri Başpınar⁷

^{1,4,5} Departments of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

^{2,6} Departments of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

³ Departments of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University,

⁷ Departments of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, 42250, Konya, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 03.07.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 26.10.2020

Abstract: This study aimed to investigate the effects of ear-tagging on blood malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (rGSH), Vitamin C (Vit C) levels, and glutathione peroxidase (GPx) activity in the acute period. Ear-tagged (with polyurethane ear-tag) animals consisted of nine healthy Holstein calves (2-3 months old). Blood samples were taken just before ear-tagging (baseline), at the 20th min, on the 3rd day, and 8th day after the ear-tagging procedure. Six Holstein calves were involved the sham group. In ear-tagged animals, plasma MDA levels increased on the 3rd day compared to baseline values ($p < 0.01$) and returned to baseline values on the 8th day, whereas no change was found in the sham group. In ear-tagged animals, plasma rGSH levels increased at the 20th min, 3rd day, and 8th day ($p < 0.001$) in comparison to baseline values, which in the sham group, there was no change. In ear-tagged animals, erythrocyte rGSH levels on the 3rd and 8th days were higher compared to baseline and 20th min level ($p < 0.01$). In the sham group, the 3rd and 8th day erythrocyte rGSH levels increased compared to baseline values ($p < 0.01$). In ear-tagged animals, the 20th min, 3rd day, and 8th day erythrocyte GPx activities were lower than the baseline values ($p < 0.001$), whereas in the sham group, no change was observed. While Vit C levels increased progressively in the sham group ($p < 0.05$), this increase was not observed in the ear-tagged group. In conclusion, ear-tagging was found to cause oxidative stress and increase antioxidant requirement in calves.

Keywords: Calf, ear-tagging, oxidative stress, polyurethane ear-tag

Kulak küpesi takılan buzağılarda akut dönemde oksidatif stres değişimleri

Özet: Bu çalışmanın amacı kulak küpelemenin akut dönemde kan malondialdehid (MDA), redükte glutatyon (rGSH), vitamin C (Vit C) düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmanın deney grubunu, kulak küpeleme (poliüretan kulak küpesi ile) yapılan dokuz adet buzağı (2-3 aylık yaşta) oluşturdu. Kan örnekleri kulak küpeleme işleminden hemen önce (temel seviye), kulak küpeleme sonrası 20. dakika, 3. gün ve 8. gün'de alındı. Ayrıca, belirtilen zamanlarda sadece kanları alınan altı adet Holstein ırkı buzağı da sham grubu olarak kullanıldı. Kulak küpeli buzağılarda 3. gün MDA seviyeleri temel seviyelere göre yükselirken ($p < 0,01$), 8. günde tekrar temel seviyelerine indi. Sham grubunda ise MDA düzeyleri yönünden bir değişiklik gözlenmedi. Kulak küpeleme grubunda plazma rGSH seviyeleri 20. dakika, 3. gün ve 8. günde temel düzeylere göre arttı ($p < 0.001$); ancak, sham grubunda bir değişim gözlenmedi. Kulak küpeli buzağılarda eritrosit rGSH seviyeleri 3. ve 8. günlerde, 20. dakika ve temel seviyelere göre yüksek olarak belirlendi ($p < 0.01$). Sham grubunda ise 3. ve 8. gün eritrosit rGSH seviyeleri temel seviyelere nazaran yüksek olarak belirlendi ($p < 0.01$). Kulak küpeleme grubunda eritrosit GPx aktiviteleri 20. dakika, 3. gün ve 8. gün'lerde temel seviyelere kıyasla düşük ($p < 0.001$) olmasına rağmen, sham grubunda bir değişim göstermedi. Sham grubunda Vit C seviyeleri giderek artmasına rağmen ($p < 0.05$), kulak küpeli hayvanlarda bu artış görülmedi. Sonuç olarak kulak küpelemenin buzağılarda oksidatif strese neden olarak antioksidan ihtiyacı arttırdığı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Buzağı, kulak küpeleme, oksidatif stres, poliüretan kulak küpesi

Introduction

According to European legislation, identification and registration of livestock such as cattle, sheep, goats, and pigs are obligatory to observe animal diseases and behavior in order to improve veterinary practices. This implementation will enable ear-

lier detection of diseases, control fertility, and yield changes resulting in improved animal welfare and efficacy (Ammendurp and Fussel 2001; Neethirajan 2017; Bailey et al. 2018; Vazquez-Diosdado et al. 2019). There are three different methods used around the globe for identification, registration

Yazışma adresi / Correspondence: Pınar Peker Akalın, Departments of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey E-mail: ppakalin@mku.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-2559-096X • ²0000-0002-6991-3727 • ³0000-0002-1910-8316 • ⁴0000-0002-9716-0697 • ⁵0000-0002-0590-6405 • ⁶0000-0002-9065-394X • ⁷0000-0002-5481-1111

and, traceability of livestock animals: 1-stamping, ear marking (notching, tattooing, and tagging), 2-electronic identification (subcutaneous injection, inside ear-tag, bolus, accelerometer), 3-Biometric methods (DNA and retinal image) (Caja et al. 2004; Thomson et al. 2016; Krieger et al. 2017, 2018). Due to its low cost in comparison to other methods, ear-tagging is currently the most widely used method around the world for individual identification of animals (Petherick 2005; Aydin 2007; Lomax et al. 2017). Also, accelerometers and radio frequency identifications are attached via ear-tags (Doğan et al. 2016; Krieger et al. 2018). Ear-tags can be present in many different shapes (rosette, button, hoop, etc.), sizes and colors, and can be made from various materials (metal, plastic) (Aydin 2007). After determining that the metal ear clips that have been used in the past could cause some lesions (Kitagaki and Hirota 2007), flexible plastic ear-tags made of polyurethane have been shown to be less harmful (Meingassner 1991; Kitagaki and Shibuya 2004) are used more commonly, today. Although studies have reported less harm with the use of plastic ear-tags compared to metal tags, plastic ear-tags have also been shown to cause some changes including ear lesions (Johnston and Edwards 1996; Edwards and Johnston 1999), ear pain (Leslie et al. 2010; Lomax et al. 2017), tachycardia (Stewart et al. 2013), and ear wounds and necrosis (Salina et al. 2016). Animal welfare targets a life free from undesired emotions such as pain, suffering, and stress (Bryant 1972; Dantzer 2001), whereas lack of stress response is regarded as an indicator of an animal's well being (Barnett and Hemsworth 1990; Broom 1998). Stress can be expressed as a biological response in the form of anatomical, physiological, and behavioral changes to internal or external stimuli that threaten the homeostasis of the organism. The response against stress may cause various effects in the organism such as changes in the immune system, problems with digestion, and cessation of reproductive and developmental functions (Kelley 1980). Stress may result in the disturbance of oxidant-antioxidant balance in favor of free radicals (Freeman and Crapo 1982). Free radicals show their effects by causing oxidation of proteins, lipids, carbohydrates, and DNA, leading to pathological changes in cell membranes, cellular organelles, and DNA. As a result, cellular dysfunctions or death occur, or resulting mutations can lead to tumorigenesis (Akkuş 1995). An antioxidant is defined as a substance that significantly delays or inhibits the oxidation of a substrate. The physiological role of antioxidants is to prevent damage to cellular components that occur as a result of chemi-

cal reactions involving free radicals (Young and Woodside 2001). The imbalance between oxidants and antioxidants results in the formation of reactive oxygen species and leads to oxidative damage. This condition is defined as oxidative stress (Kurutaş et al. 2004; Yeum et al. 2004). In animals, major antioxidant defense mechanisms include the enzymes glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase, and glutathione. Malondialdehyde levels provide information about lipid peroxide levels (Akkuş 1995). Glutathione is a low-molecular weight tripeptide synthesized from the amino acids cysteine, glutamic acid, and glycine, and it is the most important soluble antioxidant in the body (Kohen and Nyska 2002). The most effective antioxidant enzyme in the protection mechanism against lipid peroxidation in erythrocytes is GPx (Kehrer 1993; Akkuş 1995). Decreased GPx activity leads to increased hydrogen peroxide and severe cell damage (Halliwell and Gutteridge 1989). Together with α -tocopherol and Vit C (ascorbic acid), GPx suppresses the free radicals attacking biological membranes and tissue lipids. Vitamin C is a good antioxidant because of its strong reducing activity (Banudevi 2006).

Ear-tags used in the identification of livestock animals are foreign to the natural life of the animals, and therefore they are thought to induce stress, affecting well being of the animals. In our review of the literature, we observed that while some stress factors have been investigated for their stress-inducing potential (Avcı et al. 2008; Fidan et al. 2009; Çetin et al. 2011), no previous study investigated oxidative stress development due to ear-tagging in calves. In the present study, it was aimed to examine possible effects of flexible ear-tags made of polyurethane material on oxidative stress in 2-3 months old calves.

Material and Method

Materials

In the study, experimental and sham groups consisted of nine healthy Holstein calves (four males + five females) and six healthy Holstein calves (two males + four females) from a private dairy cattle farm, respectively. The calves were aged about 2-3 months old, and were not ear-tagged previously. Animals were kept in the same care and feeding conditions. The study protocol was approved by the Local Ethical Committee of Experimental Animal Ethics of Hatay Mustafa Kemal University and was performed entirely according to ethical rules (Approval no: 2014-04/1).

In the experimental group (Ear-tagged with polyurethane ear-tags, Figure 1), blood samples were properly drawn from the jugular vein of the calves into tubes containing EDTA, just before ear-tagging (baseline values). Afterward, blood samples were collected from the same animals at 20 minutes (20th min), 3rd day, and 8th day after the ear-tagging procedure. For the sham group, in order to examine the effect of stress caused by the blood drawing procedure, blood samples were drawn with the same intervals specified above from the calves which did not undergo the ear-tagging procedure. Blood samples were properly centrifuged (3000 rpm x 10 minutes x +4°C) in order to obtain plasma samples. After separating the plasma portion of the samples, the remaining cellular portion was washed three times with PBS solution. Consequently, one unit of erythrocyte suspension was mixed with five units of distilled water in order to obtain erythrocyte hemolysate. Plasma and erythrocyte hemolysate samples were then stored at -20°C until the biochemical analyses.

Methods

Reduced GSH activity in the erythrocyte hemolysate was measured using the method described by Ellman (1959) as a dithionitrobenzoic acid recycling assay. Erythrocyte hemolysate GPx activity was determined by Beutler's (1975) method, which is based on detection of the change in absorbance at 340 nm using hydrogen peroxide in the presence of NADPH. Erythrocyte hemoglobin levels were determined using Drabkin's (Sigma) solution. Plasma MDA levels were determined by the method described by

Ohkawa et al. (1979), which is based on spectrophotometric detection of the formation of the pink-colored complex from MDA and tribarbutyric acid at 532 nm. Analysis of plasma Vit C was performed using Haag's (1985) method based on the formation of 2,4-dinitrophenylhydrazone following reaction of dehydroascorbic acid and diketogulonic acid with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and spectrophotometric detection of this product was at 520 nm.



Figure 1. Ear-tags used in the study.

Statistical Analysis

All the values are expressed as mean $\pm$ SE. The results of the groups were analyzed by ANOVA with posthoc Duncan multiple range tests (SPSS for Windows, release 12.0). In all cases, the probability of error of less than 0.05 was chosen as the criterion of statistical significance.

Results

Plasma and erythrocyte oxidative stress parameters in Ear-Tag and control groups are given in Table 1 and 2.

Table 1. Plasma and erythrocyte oxidative stress parameters in ear-tagged group (Mean $\pm$ SE), (n=9).

Ear-Tagged group	MDA nmol/ml	rGSH μ M plasma	rGSH μ mol/g hg	GPx U/g hg	Vit C mg/dl
Baseline	1.41 $\pm$ 0.06 ^{bc}	33,25 $\pm$ 3,40 ^a	2.60 $\pm$ 0.53 ^a	71,94 $\pm$ 1.93 ^a	0.45 $\pm$ 0.04 ^{ab}
20 th min	1.64 $\pm$ 0.08 ^{ab}	43,76 $\pm$ 3.26 ^b	2.75 $\pm$ 0.29 ^a	36,75 $\pm$ 3.08 ^b	0.32 $\pm$ 0.04 ^a
3 rd day	1.81 $\pm$ 0.12 ^a	48,57 $\pm$ 2.22 ^{bc}	4.85 $\pm$ 1.07 ^b	39.68 $\pm$ 4.96 ^b	0.37 $\pm$ 0.04 ^{ab}
8 th day	1.36 $\pm$ 0.10 ^c	52.12 $\pm$ 1.52 ^c	6.94 $\pm$ 0.66 ^b	37.11 $\pm$ 5.11 ^b	0.48 $\pm$ 0.08 ^b
p	<0.01	<0.001	<0.01	<0.001	<0.05

a, b, c, d-values with different letters in the same column are statistically significant ($p < 0.05$).

Table 2. Plasma and erythrocyte oxidative stress parameters in the sham (non-ear-tagged) group (Mean $\pm$ SE), (n=6).

Sham Group	MDA nmol/ml	rGSH μ M plasma	rGSH μ mol/g hg	GPx U/g hg	Vit C mg/dl
Baseline	0.38 $\pm$ 0.04	34.90 $\pm$ 4.73 ^{ab}	0.56 $\pm$ 0.23 ^a	60.30 $\pm$ 8.44	0.53 $\pm$ 0.07 ^a
20 th min	0.38 $\pm$ 0.06	30.73 $\pm$ 1.88 ^a	0.74 $\pm$ 0.32 ^{ab}	62.18 $\pm$ 3.35	0.68 $\pm$ 0.12 ^{ab}
3 rd day	0.45 $\pm$ 0.11	41,15 $\pm$ 2.04 ^b	1.85 $\pm$ 0.48 ^b	69,85 $\pm$ 2.20	0.80 $\pm$ 0,20 ^{ab}
8 th day	0.59 $\pm$ 0.02	36,98 $\pm$ 3.37 ^{ab}	3.32 $\pm$ 0.44 ^c	62,64 $\pm$ 1.44	1.10 $\pm$ 0.26 ^b
p	-	<0.05	<0.01	-	<0.05

a, b, c, d-values with different letters in the same column are statistically significant ($p < 0.05$).

In ear-tagged animals, plasma MDA levels were found to be increased on the 3rd day compared to the baseline values ($p < 0.01$), whereas MDA levels returned to the baseline values on the 8th day. On the other hand, non-ear-tagged animals (sham group) did not show any change in serum MDA levels.

In ear-tagged animals, plasma rGSH levels were found to be increased at 20th min, 3rd day, and 8th day ($p < 0.001$) in comparison to baseline values. In non-ear-tagged animals, plasma rGSH levels at 20th min, 3rd day, and 8th day were not significantly different compared to the baseline values. However, 3rd day plasma rGSH levels were higher than 20th min levels ($p < 0.05$). In ear-tagged animals, erythrocyte rGSH levels on the 3rd and the 8th days were higher compared to baseline and 20th minute levels ($p < 0.01$). In non-ear-tagged animals, 3rd day and 8th day erythrocyte rGSH levels were increased compared to baseline values ($p < 0.01$).

In ear-tagged animals, 20th min, 3rd day, and 8th day erythrocyte GPx levels were lower than the baseline values ($p < 0.001$), whereas in non-ear-tagged animals, erythrocyte GPx levels measured at the same time intervals did not change significantly.

Plasma Vit C levels did not show a significant change in ear-tagged animals. In non-ear-tagged animals, 20th min, 3rd day, and 8th day plasma Vit C levels were higher than the baseline; however, the difference was only significant on the 8th day ($p < 0.05$).

Discussion

In the present study, we investigated the effects of ear-tagging on oxidant/antioxidant equilibrium in calves by measuring plasma MDA, rGSH, Vit C, and erythrocyte rGSH and Gpx. Measurement of thiobarbituric acid reactants such as MDA, conjugated dienes, and lipid hydroperoxides is commonly used in the determination of cellular damage caused by oxidative stress (Carr et al. 1995). In the present study, while plasma MDA levels were increased on the 3rd day of ear-tagging compared to the baseline values, this increase was not observed in non-ear-tagged animals. To our knowledge, the effects of ear-tagging on MDA levels were not reported. As transport stress has been shown to increase serum MDA levels in cattle (Chirase et al. 2004), we may conclude that the ear-tagging procedure causes stress during the first days of the procedure, because on the 8th day MDA levels returned to the baseline values.

Glutathione peroxidase is a highly effective antioxidant enzyme against oxidative stress in erythrocytes. It functions in reduction of the hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by oxidizing the rGSH in the cell. Reduced GPx activity leads to increased hydrogen peroxide and severe cell damage (Halliwell and Gutteridge, 1989; Dundar and Aslan 2000; Çetin et al. 2011). In the present study, while erythrocyte GPx activity did not change in the sham group, it was found to be significantly reduced at 20th min, 3rd day, and 8th day in the ear-tagged animals when compared to the baseline values ($p < 0.001$). Also, the findings of the present study indicated that following ear-tagging, rGSH levels (both in plasma and erythrocyte) were increased. Reduced GSH is transformed into oxidized GSH during scavenging of free radicals by GPx (Akkuş 1995). In ear-tagged animals, reduced GPx activity in the erythrocytes may have caused decreased rGSH utilization, and thereby, resulted in increased intracellular rGSH levels. Erythrocyte lysis has been shown as a source of antioxidants found in the plasma. Decreased erythrocyte GPx activity and increased MDA level have been reported to be responsible for the increased plasma GPx activity (Ines et al. 2006; Öztürk et al. 2008). In the present study, plasma rGSH levels are thought to be increased as a result of reduced erythrocyte GPx activity and increased MDA levels in parallel with erythrocyte lysis. In the sham group, there was also an increase in erythrocyte rGSH levels, however, unaltered erythrocyte GPx, plasma MDA, and plasma rGSH levels suggest that the oxidative stress was less intense in the non-ear-tagged animals.

Vitamin C is synthesized in the liver in ruminants. In calves, plasma Vit C levels vary according to developmental stages (Bouda et al. 1980). In the present study, Vit C levels increased progressively in the sham group (statistically significant difference was observed on the 8th day). This increase may be attributed to the Vit C content of feed given to the animals during the study. On the other hand, serum Vit C increase was not observed in the ear-tagged group which maybe because of the consumption of Vit C due to the increased oxidative stress in the ear-tagged animals. Plasma Vit C levels have been shown to decrease following oxidative stress in the body (Polidori et al. 2001; Weiss 2001), and Vit C supplementation as an antioxidant in the diet has favorable effects on stress parameters in sheep that were subjected to transport stress (Avcı et al., 2008).

Today, as a result of the developments in the field of biotechnology, non-invasive animal identi-

fication methods (DNA and retinal image) are being developed, but due to the high cost of these techniques, ear-tagging still maintains its popularity. Analgesic use during the ear-tagging procedure has been shown to reduce pain in the animals (Lomax et al. 2017); therefore, it may also reduce the stress associated with ear-tagging as well. A recent study on the identification of sheep using leg tagging method (Abacia and Palacin 2014) has shown that leg tags could be used conveniently in different stages of development in sheep.

In conclusion, ear-tagging was found to cause oxidative stress and increase antioxidant requirement in calves. For that reason, we believe it would be beneficial to provide supplementation of Vit C and other agents known to have beneficial effects on stress before and/or during ear-tagging, and also to use analgesic and antiinflammatory agents during ear-tagging.

There is no person / organization that supported the study financially and the authors have no conflict of interest.

Acknowledgements: This study was approved by Mustafa Kemal University Local Ethic Committee (24.04.2014 and 2014-04/1).

References

- Abacia JA, Placin I. (2014) Use of electronic leg tags for identification of small ruminants. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 33(3), 1-16.
- Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. MIMOZA Press. Turkey, 5-25.
- Ammendurp S, Fussel AE. (2001) Legislative requirements for the identification and traceability of farm animals within the European Union. *Rev Sci Tech.* 20(2), 437-444.
- Avcı G, Küçükkurt İ, Fidan F, Eryavuz A, Aslan R, Dündar Y. (2008) Nakil işlemine tabi tutulan koyunlarda vitamin c ve ksilazin uygulamasının kortizol ve lipid peroksidasyon ile bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *FÜ Sağ Bil Derg.* 22(3), 147-152.
- Aydın A. (2007) Avrupa Birliği ve Türkiye'de hayvanların kimliklendirilmesi ve kayıt altına alınmasının göreceli karşılaştırılması, izlenebilirlik. AB uzmanlık tezi. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Vignesh C, Aruldash MM, Arunakaron J. (2006) Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology.* 10, 243-252.
- Bailey DW, Trotter MG, Knight CW, Thomas MG. (2018) Use of GPS tracking collars and accelerometers for rangeland livestock production research. *Transl Anim Sci.* 2, 81-88.
- Barnett JL, Hemsworth PH. (1990) The validity of physiological and behavioural measures of animal welfare. *Appl Anim Behav Sci.* 25, 177-187.
- Bouda J, Jagos P, Dvorak R, Ondrova J. (1980) Vitamin E and C in the blood plasma of cows and their calves fed from buckets. *Acta Vet Brno.* 49, 53-58.
- Beutler E. (1975) Red cell metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods., Grune Strottan, New York. p. 67-69.
- Broom DM. (1998) Welfare stress and the evolution of feelings. *Adv Study Behav.* 27, 371-403.
- Bryant MJ. (1972) The social environment: behaviour and stress in housed livestock. *Vet Rec.* 90, 351-359.
- Caja G, Ghirardi JJ, Hernández M. (2004) Diversity of animal identification techniques: from fire age to electronic age. *ICAR Technical Series.* 9, 21-37.
- Carr TP, Andersen CJ, Rudel LL. (1993) Enzymatic determination of triglyceride free cholesterol and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem.* 26, 39-42.
- Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, Loan RW, Auvermann BW, Parker DB, Walford EF, Stevenson DE, Xu Y, Klauning JE. (2004) Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res.* 65, 860-864.
- Çetin E, Çetin N, Küçük O. (2011a) Toklularda karayolu ile taşımının bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisi. *Erciyes Üni Vet Fak Derg.* 8, 97-103.
- Çetin E, Çetin N, Küçük O. (2011b) Toklularda Karayolu ile taşımının oksidan- antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 6(2), 103-109.
- Dantzer R. (2001) Stress emotions and health: where do we stand? *Dantzer Social Science Information.* 40, 61-78.
- Dilek ON. (2003) Serbest Radikaller ve Cerrahi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III. Ulusal Kongresi, March 23-30 Afyon-Turkey.
- Doğan H, Çağlar MF, Yavuz M, Gözel MA. (2016) Use of radio frequency identification systems on animal monitoring sdu. *Int J Techn Sci.* 8, 38-53.
- Dündar Y, Aslan R. (2000) Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. First ed. Afyon Kocatepe Üniversitesi yayınları, Afyon, Türkiye.
- Edwards DS, Johnston AM. (1999) Welfare implications of sheep ear tags. *Vet Rec.* 144, 603-606.
- Ellman G. (1959). Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Fidan AF, Kucukkurt I, Eryavuz A, Cigerci IH, Yardimci M, Ozdemir A. (2009) Effects of shearing procedures on oxidant-antioxidant status in Chios sheep (Effets de la tonte sur l'équilibre oxydants / antioxydants chez le mouton Chios). *Revue De Medecine Veterinaire.* 160(7), 349-355
- Freeman BA, Crapo JD. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47, 412-426.
- Haag W. (1985) Zur methodik und praktischen Bedeutung der Vitamin C-Bestimmung bei im Rind in Vergangenheit und Gegenwart. Inaugural Dissertation. Justus Liebig Universität, Giessen.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989) Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press.
- Ines D, Sonia B, Riadh BM, Amel EG. (2006) A comparative study of oxidant-antioxidant status in stable and active vitiligo patients. *Arch Dermatol Res.* 298, 147-152.
- Johnston AM, Edwards DS. (1996) Welfare implications of identification of cattle by ear tags. *Vet Rec.* 138 (25), 612-614.
- Kehrer JP. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23 (1), 21-48.
- Kelley KW. (1980) Stress and immune function: A bibliographic review. *Ann Rech Vet.* 11, 445-478.
- Kitagaki M, Shibuya K. (2004) Nylon ear tags for individual identification of guinea pigs. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 43, 16-20.
- Kitagaki M, Hirota M. (2007) Auricular chondritis caused by metal ear tagging in C57BL/6 mice. *Vet Pathol.* 44(4), 458-66.

- Kohen R, Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30 (6), 620-650.
- Krieger S, Sattlecker G, Kicking F, Auer W, Drillich M, Iwersen M. (2017) Prediction of calving in dairy cows using a tail-mounted tri-axial accelerometer: a pilot study. *Biosyst Eng.* 173, 79-84.
- Krieger S, Oczak M, Lidauer L, Berger A, Kicking F, Oelschuster M, Auer W, Drillich M, Iwersen M. (2018). Ear-attached accelerometer as an on-farm device to predict the onset of calving in dairy cows. In: 14th International Conference on Precision Agriculture. June 24-June 27 2018, Montreal, Quebec, Canada. Lenth, R.V., 2016. Least-squares means: the R package lsmmeans. *J Stat.* 69, 1-33.
- Kurutaş BE, İnanç GF, Kılınç M. (2004) Serbest Radikaller. *Arşiv.* 13, 120-123.
- Lomax S, Witenden E, Windsor P, White P. (2017) Effect of topical vapocoolant spray on perioperative pain response of unweaned calves to ear tagging and ear notching. *Vet Anaesth Analg.* 44 (1), 163-172.
- Meingassner JG. (1991) Sympathetic auricular chondritis in rats: a model of autoimmune disease. *Lab Anim.* 25, 68-78.
- Neethirajan S. (2017) Recent advances in wearable sensors for animal health management. *Sens. Biosensing Res.* 12, 15-29.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-358.
- Öztürk IC, Batcioglu K, Karataş F, Hazneci E, Genç M. (2008) Comparison of plasma malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, hydroxyproline and selenium levels in patients with vitiligo and healthy controls. *Ind J Dermatol.* 53(3), 106-110.
- Petherick JC. (2005) Animal welfare issues associated with extensive livestock production: the northern Australian beef cattle industry. *Appl Anim Behav Sci.* 92, 211-234.
- Polidori MC, Mecocci P, Frei B. (2001) Plasma vitamin C levels are decreased and correlated with brain damage in patients with intracranial hemorrhage or head trauma. *Stroke.* 32(4), 898-902.
- Salina AB, Hassan L, Saharee AA, Stevenson MA, Ghazali KA. (2016) Comparison of RFID and visual ear tag retention in dairy cattle in Malaysia. *Proc Instem LPVT.* 178-182.
- Stewart M, Shepherd HM, Webster JR, Waas JR, McLeay LM, Schütz KE. (2013) Effect of previous handling experiences on responses of dairy calves to routine husbandry procedures. *Animal.* 7(5), 828-833.
- Thompson R, Matheson SM, Plötz T, Edwards SA, Kyriazakis I. (2016) Porcine lie detectors: automatic quantification of posture state and transitions in sows using inertial sensors. *Comput Electron Agr.* 127, 521-530.
- Yeum KJ, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G. (2004) Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys.* 430, 97-103.
- Young IS, Woodside JV. (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 54, 176-186.
- Weiss WP. (2001) Effect of dietary vitamin C on concentrations of ascorbic acid in plasma and milk. *J Dairy Sci.* 84(10), 2302-2307.
- Vazquez-Diosdado JA, Paul V, Ellis AK, Coates D, Loomba R, Kaler J. (2019) A combined offline and online algorithm for real-time and long-term classification of sheep behaviour: novel approach for precision livestock farming. *Sensors.* 19, 3201.



The effect of iron on the expression of hemolysin/cytolysin and growth of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*

Sedat Çam¹

¹ Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 31.08.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 26.10.2020

Abstract: Elevated levels of iron are strongly correlated with the growth and virulence of highly lethal human-pathogen *Vibrio vulnificus*. The present study examined the expression level of hemolysin/cytolysin-encoding gene (*vvhA*) and the growth rate of four clinical and four environmental strains of *V. vulnificus* under different iron concentrations (7, 10, 15, 30, and 50 μ M). The expression levels of *vvhA* were determined according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *vvhA* transcription was down-regulated as iron concentration increased. A significant difference was observed at the level of 30 and 50 μ M ferric chloride concentrations compared to the lower concentrations in all the strains tested ($p < 0.001$). Conversely, elevated iron concentration was significantly correlated with the higher growth rates of all the isolates ($p < 0.05$). Increasing iron levels elevated the growth rate of the strains. Clinical strains appeared to be more correlated with high iron levels than environmental isolates. This study suggested that relatively increased growth rates of clinical strains of *V. vulnificus* under elevated iron concentrations might explain the higher virulence of this pathogen in patients with iron overload from an underlying disease.

Keywords: Growth, iron, pathogen, virulence, *vvhA*

Demirin *Vibrio vulnificus*'un klinik ve çevresel suşların büyümesi ve hemolizin/sitolizin ekspresyonu üzerine etkisi

Özet: Yüksek demir seviyeleri, oldukça ölümcül bir insan patojeni olan *Vibrio vulnificus*'un büyümesi ve virülansı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu çalışma, farklı demir konsantrasyonları altında (7, 10, 15, 30 ve 50 μ M) dört klinik ve dört çevresel *V. vulnificus* suşlarının, büyüme oranlarını ve hemolizin/sitolizin kodlayan genin (*vvhA*) ekspresyon seviyelerini incelemiştir. Ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre belirlenmiştir. Demir konsantrasyonu arttıkça *vvhA* transkripsiyon aşağı regülasyonu gözlenmiştir. Test edilen tüm suşlarda, 30 ve 50 μ M ferrik klorür konsantrasyonları seviyesinde düşük konsantrasyonlara kıyasla anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,001$). Artan demir konsantrasyonu, tüm izolatların daha hızlı büyüme oranları ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur ($p < 0,05$). Demir seviyesinin artması, suşların büyüme oranını artırmıştır. Daha virülans etki gösteren klinik suşların demir ile korelasyonu çevresel izolatlardan daha yüksek olarak gözlenlenmiştir. Bu çalışma, yüksek demir konsantrasyonları altında *V. vulnificus*'un klinik suşlarının nispeten artmış büyüme oranlarının, altta yatan bir hastalıktan dolayı aşırı demir yükü olan hastalarda bu patojenin daha yüksek virülansını açıklayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Büyüme, demir, patojen, virülans, *vvhA*

Introduction

Vibrio vulnificus is a species that causes very severe foodborne disease and accounts for the highest seafood-related fatalities in the United States (Baker-Austin and Oliver 2018). This highly fatal human pathogen, ubiquitous in coastal seawaters, has been isolated in large numbers from molluscan shellfish (Baker-Austin and Oliver 2018). Infections typically occur from the ingestions of contaminated raw shellfish consumptions, particularly oysters, and by contamination of pre-existing wounds during recreational activities (Horseman and Surani 2011). The most deadly disease is septicemia with a death rate of $> 50\%$ particularly in susceptible individuals

having a high level of serum iron and immune deficiencies (Leng et al. 2019). This pathogen also leads to severe necrotizing wound infections in immunocompromised patients with a 25% mortality rate (Oliver 2005). Although rare, death occurs within an average of two days following the onset of disease (Jones and Oliver 2009).

Hemolysin/cytolysin (*vvhA*) is one of the putative virulence factors associated with the pathogenesis of *V. vulnificus*. *vvhA*-encoding exotoxin facilitates iron uptake by lyses of hemoglobin and is responsible for cytotoxic activity (Jones and Oliver 2009). The pathological role of extracellular hemolysin/cytolysin is under dispute. One study reported

that the toxin is not responsible for the lethality of *V. vulnificus* since mutation of *vvhA* shows no difference in the 50% lethal dose in iron-loaded mice (Wright and Morris 1991). However, other researchers revealed the pathogenic significance of the toxin (Lee et al. 2005; Senoh et al. 2005; Jeong and Satchell 2012). Purified *vvhA* enhances vascular permeability, skin damage, and mortality rate in animal models (Gray and Kreger 1987), and submicrogram level of the pore-forming hemolysin/cytolysin was found to be lethal to mice (Park et al. 1996).

Iron is an essential growth factor for most microorganisms. Increased serum iron levels are highly correlated with the pathogenesis of *V. vulnificus* infections. Two hypotheses were put forth about how excess iron provides advantages to this flesh-eating pathogen: 1) Elevated iron levels significantly increase the growth rate of *V. vulnificus*, thus enhance host susceptibility to infection, and 2) decreases neutrophil activity (Jones and Oliver 2009). Injection of iron into mice significantly reduced LD₅₀ and dramatically increased the mortality rate (Wright and Morris 1991). Moreover, a direct correlation was observed between host iron availability and the infectious dose of *V. vulnificus* (Jones and Oliver 2009). Interestingly, high iron content was found to be selective for more virulent clinical isolates of *V. vulnificus* (Çam and Brinkmeyer 2019), and a high correlation was observed between biofilm formation and increasing iron concentrations under in vitro conditions (Çam and Brinkmeyer 2020). Previous studies revealed that the presence of 16S rRNA *type B* and *vcgC* genes indicates 'clinical' origin while 16S rRNA *type A* and *vcgE* genes are significantly associated with environmental strains (Çam et al. 2019). In a previous study, the iron concentration of APW was found ~7 µM (Çam and Brinkmeyer 2019), therefore minimum iron concentration was 7 µM in this study. As proposed by several studies, iron is of utmost importance for the growth and virulence of this pathogen. The objective of this study was to examine the expression of the virulence gene, *vvhA*, in clinical and environmental strains of *V. vulnificus* under different iron concentrations.

Materials and Methods

Isolates and experimental design: A clinical (from a patient) strain was obtained from the US FDA. This clinical strain was obtained from the patient infected by *V. vulnificus* and considered as highly virulent. Three clinical and four environmental isolates were harvested from oyster and seawater, respectively

(Table 1) and verified with a strain-specific gene-*vvhA* (Campbell and Wright 2003). To differentiate the clinical strains from environmental ones, 16S rRNA *type B/A* and *vcgC/E* genes were employed. Isolates were kept in Alkaline Peptone Water (APW) with 2% NaCl at 37 °C.

Table 1. *V. vulnificus* strains used in this study.

Strain ID	Type/Source	16S type/ <i>vcg</i>
Clin-P	Clinical/Patient	B/C
Clin-O-1	Clinical/Oyster	B/C
Clin-O-2	Clinical/Oyster	B/C
Clin-S	Clinical/Seawater	B/C
Env-O-1	Environmental/Oyster	AB/E
Env-O-2	Environmental/Oyster	A/E
Env-S-1	Environmental/Seawater	A/E
Env-S-2	Environmental/Seawater	A/E

All isolates were confirmed with species-specific *vvhA* gene.

APW medium was supplemented with different concentrations of ferric chloride (FeCl₃) before inoculation. Final iron concentrations of incubation medium were 7, 10, 15, 30, and 50 µM. APW broth (2% NaCl, pH 7.4) was then inoculated with *V. vulnificus* strains (~1 × 10⁶ cells ml⁻¹) separately in falcon tubes and incubated at 37 °C by shaking at 120 rpm. Aliquots were sampled at 8 h of growth to determine the expression of the virulence gene and the growth rates of *V. vulnificus* strains with increasing iron concentrations. All experiments were performed in duplicate with three replicates.

RNA extraction and cDNA synthesis: CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) protocol was followed for nucleic acid extraction (Çam et al. 2019). DNA was degraded with DNase I (Sigma). RNA concentrations were determined spectrophotometrically. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher) was employed to synthesize cDNA based on the protocol described by the manufacturer.

Determination of relative gene expression: The expression of *vvhA* was determined using probe assay with *vvhA* primers (Campbell and Wright 2003) (Table 2). Quantitative RT-PCRs were performed in a 25 µl volume of reaction mixture consisting of 1 × PCR Buffer, 1 µM of each primer, 250 nM probe, 200 nM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1 × BSA, PCR water, 1 U Taq DNA polymerase (ThermoFisher Scientific), and different concentrations of cDNA. Thermo-cycling conditions were set up at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 60 s.

Table 2. Primers and probes used to determine expression levels of the genes in *V. vulnificus*.

Primer or Probe	Primer Sequence (5'-3')	References
VvhA-F	TGTTTATGGTGAGAACGGTGACA	(Campbell and Wright 2003)
VvhA-R	TTCTTTATCTAGGCCCAAACTTG	
VvhA-probe	(Texas Red)-CCGTTAACCGAACCACCCGCAA ⁻ (BHQ1)	
GyrB-F	GGTACCACGGTACGTTTCTG	(Bisharat et al. 2005)
GyrB-R	CTTACGCGGTGTCATTTAC	

The relative gene expressions were determined based on the threshold cycle according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001). The cycle threshold (C_t) values of the target genes were normalized to the GyrB house-keeping gene (DNA gyrase, subunit B) (Bisharat et al. 2005). In the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, the differences between the C_t values (ΔC_t) of the *vvhA* gene and the GyrB house-keeping gene were calculated. The difference in ΔC_t values between iron-treated and non-treated samples $\Delta\Delta C_t$ was then calculated. The fold differences of the genes between the two samples were $2^{-\Delta\Delta C_t}$. All real-time PCRs were performed in SmartCycler (ThermoFisher Scientific).

Growth rate: The growth rates of the isolates (generations/h) at various concentrations of ferric chloride were determined based on optical density (OD). OD was measured at 600 nm with a spectrophotometer (Biotek). OD readings were converted to cell counts by making standard curves for each strain, separately. Growth rates were calculated with the formula shown in the study (Çam and Brinkmeyer 2020). Cell count experiments were duplicated with three replicates.

Statistical analysis: Bartlett's test was used for the equality of variances. One-way ANOVA and linear regression analysis were performed in SPSS statistics 24.0.

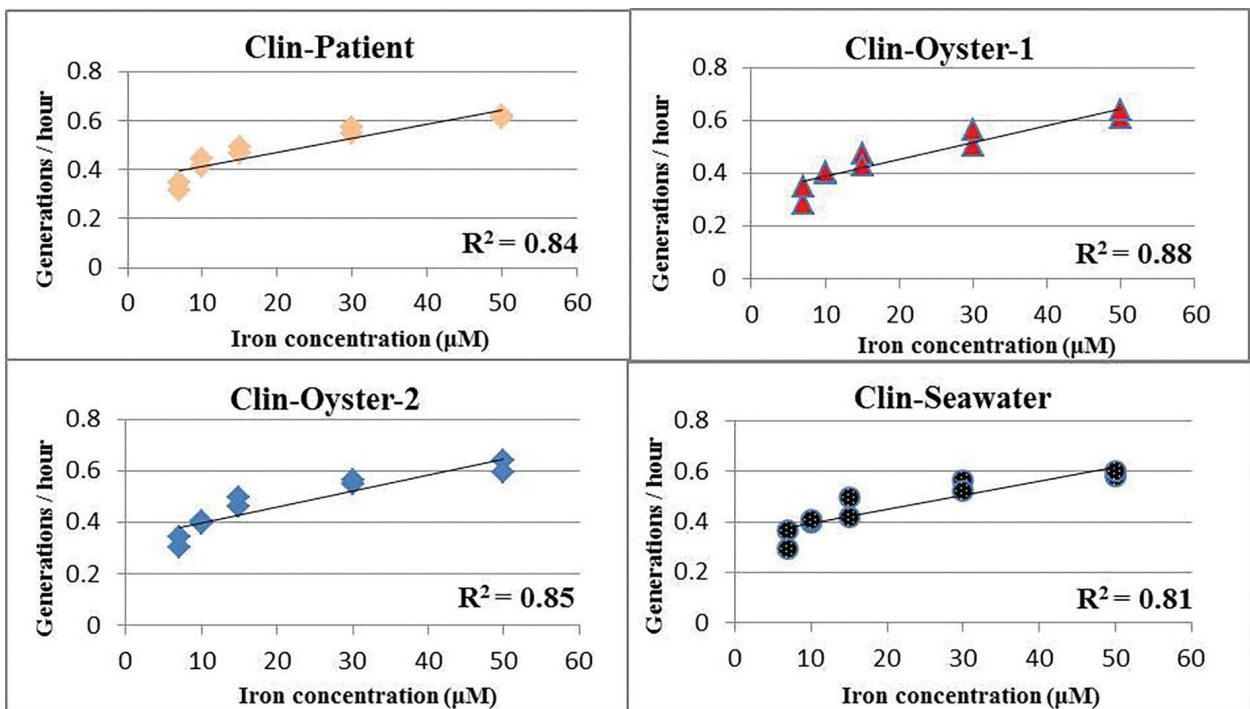
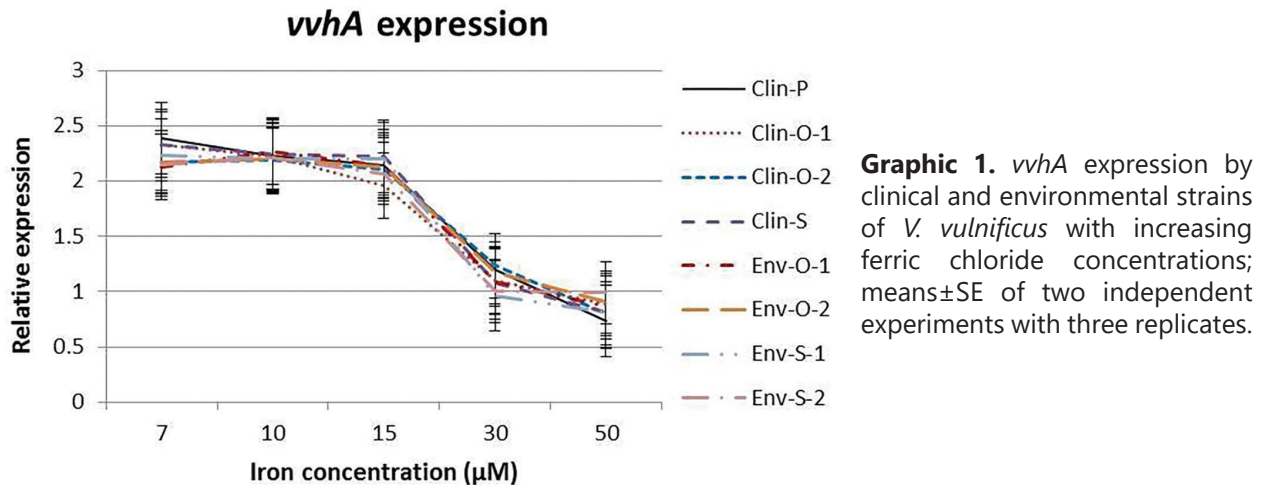
Results and Discussion

Iron is an essential factor for the pathogenesis of *V. vulnificus* in infected individuals. Excessive iron significantly decreases LD_{50} and dramatically increases the mortality rate of this pathogen in mice (Jones and Oliver 2009), therefore the current study aimed to investigate the increasing iron concentrations on *vvhA* expression and the growth rate of clinical and environmental strains of *V. vulnificus* under in vitro conditions.

Transcription of *vvhA* was down-regulated as iron concentration increased in all the strains tested (Graphic 1). The strains exhibited almost similar expression patterns in all iron levels. The groups

exhibited significant differences (one-way ANOVA, $p < 0.001$). The level of *vvhA* transcription in all the isolates was significantly decreased at 30 and 50 μM compared to the lower iron concentrations (Bonferroni *post hoc* test, $p < 0.001$). These results show that *vvhA* transcription is repressed by increasing iron levels. The present finding is in good agreement with the study (Kim et al. 2009), suggesting that *vvhA* expression can be repressed by iron via Fur and LuxS quorum-sensing system. Quorum-sensing is a bacterial communication system that regulates gene expression levels in response to cell population density in a particular environment by releasing specific signaling molecules. In *V. vulnificus*, mutation analyses showed that LuxS quorum-sensing system plays important roles in virulence regulation along with other virulence regulators. Inactivation of *luxS* through mutations revealed that the transcriptional activity of *vvhA* is negatively controlled by *luxS* transcription (Kim et al. 2003). Besides, iron increases *LuxS* expression in *V. vulnificus* (Kawase et al. 2004). Therefore, in the current study, the down-regulation of *vvhA* in the presence of excessive iron might be attributed to increased activity of the LuxS quorum-sensing system.

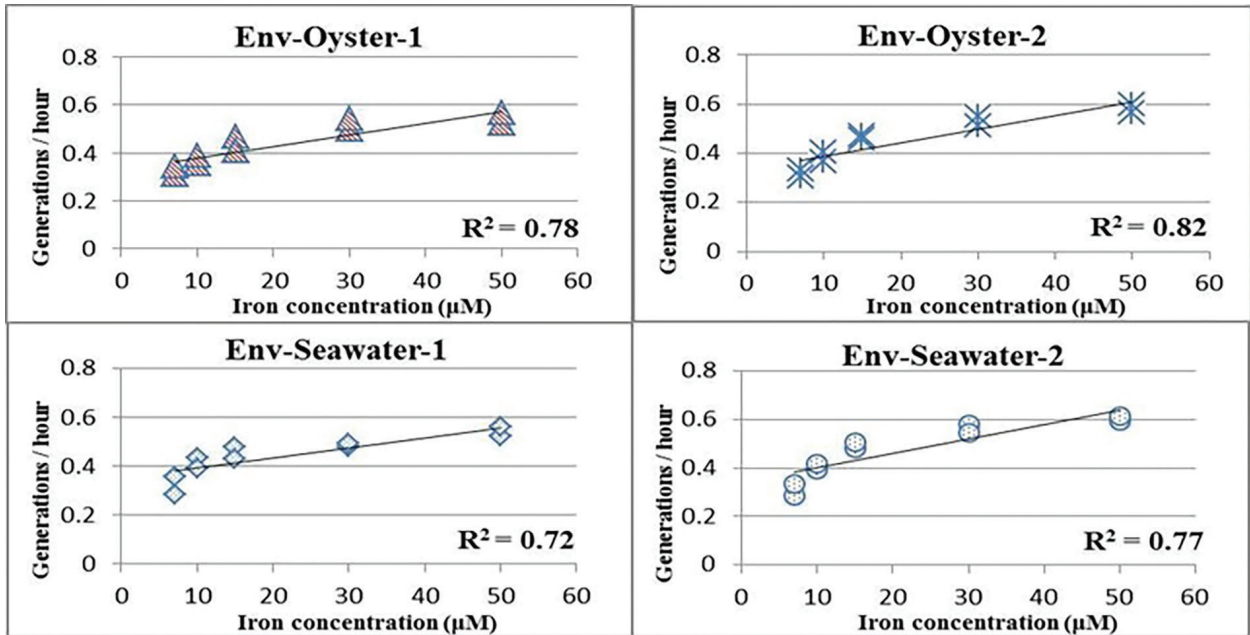
The growth rates of clinical and environmental isolates were found to be significantly correlated with elevated iron concentrations (Linear regression, $p < 0.05$) (Graphic 2 and 3). Higher levels of ferric chloride enhanced the growth rates of the strains. Similar results were also obtained by the other studies (Hor et al. 2000; Starks et al. 2006; Kim et al. 2009), revealing that excess iron stimulates *V. vulnificus* growth. Iron serves as an important redox catalyst for various cellular processes such as respiration and DNA replication in microorganisms (Cassat and Skaar 2013). This pathogen is a ferrophilic microorganism and requires high concentrations of iron for growth (Kim et al. 2007); as a result, causing increased susceptibility of iron-overloaded patients to infections (Hor et al. 2000; Cassat and Skaar 2013). The patients with enhanced iron concentrations from an underlying disease were also found to be more susceptible to infections in other pathogens (Cassat and Skaar 2013).



Graphic 2. Growth rates (generations/hour) of clinical strains of *V. vulnificus* with increasing ferric chloride concentrations (average of two independent experiments with three replicates) (Linear regression, $p < 0.05$).

Clinical strains displayed higher correlation rates than environmental strains under increasing iron concentrations (Graphic 2 and 3). R^2 values ranged from 0.81 to 0.88 in clinical strains and from 0.72 to 0.82 in environmental isolates. The highest correlations were observed in the clinical strains obtained from oysters, followed by another clinical strain from the patient. The lowest R^2 values (0.72 and 0.77) were found in environmental strains isolated from seawater. As observed in the current study, Starks et al. (2006) studied differential growth

rates of clinical and environmental *V. vulnificus* isolates in the presence of excess iron in mice, indicating that an excessive amount of iron significantly increases the growth rates of clinical strains tested (Starks et al. 2006). The higher virulence of clinical strains might be explained by relatively higher growth and replication rates of the isolates at higher iron concentrations because the main reason for *V. vulnificus* infection is mostly attributed to increased serum iron concentrations in susceptible individuals (Hor et al. 2000; Kim et al. 2007; Kim et al. 2009).



Graphic 3. Growth rates (generations/hour) of environmental strains of *V. vulnificus* with increasing ferric chloride concentrations (average of two independent experiments with three replicates) (Linear regression, $p < 0.05$).

In conclusion, the present study revealed that excessive amounts of iron dramatically decreased transcription of *vvhA* and significantly increased the growth rates of *V. vulnificus* strains. The higher mortality rate of this microorganism in patients having an underlying disease such as hemochromatosis might be likely the increasing growth rates of this pathogen under high iron serum levels. Iron appeared to be more correlated with the growth rate of clinical strains rather than environmental isolates.

Use of laboratory animals Ethics Committee and other decisions of Ethics Committee and Permissions: No animal used.

Acknowledgment: It has not been presented in any Congress.

Financial Support and Conflict of interest: There is no person/institution funding the work and author has no conflicts of interest.

References

- Baker-Austin C, Oliver JD. (2018) *Vibrio vulnificus*: New insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ Microbiol.* 20, 423-430.
- Bisharat N, Cohen DI, Harding RM, Falush D, Crook DW, Peto T, Maiden MC. (2005). Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerg Infect Dis.* 11, 30-35.
- Campbell MS, Wright AC. (2003). Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Appl Environ Microbiol.* 69, 7137-7144.
- Cassat JE, Skaar EP. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe.* 13, 509-519.
- Çam S, Brinkmeyer R. (2019). Development of selective enrichment medium for clinical isolates of *Vibrio vulnificus* based upon virulence correlating genes. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 8, 173-179.
- Çam S, Brinkmeyer R. (2020). The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Folia Microbiol.* 65, 557-566.
- Çam S, Brinkmeyer R, Schwarz JR. (2019). Quantitative PCR enumeration of *vagC* and 16S rRNA type A and B genes as virulence indicators for environmental and clinical strains of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay oysters. *Can J Microbiol.* 65, 613-621.
- Gray LD, Kreger AS. (1987). Mouse skin damage caused by cytotoxin from *Vibrio vulnificus* and by *V. Vulnificus* infection. *J Infect Dis.* 155, 236-241.
- Hor L, Chang Y, Chang C, Lei H, Ou JT. (2000). Mechanism of high susceptibility of iron-overloaded mouse to *Vibrio vulnificus* infection. *Microbiol Immunol.* 44, 871-878.
- Horseman MA, Surani S. (2011). A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: An important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis.* 15, e157-e166.
- Jeong HG, Satchell KJF. (2012). Additive function of *Vibrio vulnificus* *martx(vv)* and *vvhA* cytotoxins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection. *PLoS pathog.* 8, e1002581.
- Jones MK, Oliver JD. (2009). *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis. *Infect Immun.* 77, 1723-1733.

- Kawase T, Miyoshi S, Sultan Z, Shinoda S. (2004). Regulation system for protease production in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett.* 240, 55-59.
- Kim CM, Chung YY, Shin SH. (2009). Iron differentially regulates gene expression and extracellular secretion of *Vibrio vulnificus* cytolysin-hemolysin. *J Infect Dis.* 200, 582-589.
- Kim CM, Park RY, Choi MH, Sun HY, Shin SH. (2007). Ferrophilic characteristics of *Vibrio vulnificus* and potential usefulness of iron chelation therapy. *J Infect Dis.* 195, 90-98.
- Kim SY, Lee SE, Kim YR, Kim CM, Ryu PY, Choy HE, Chung SS, Rhee JH. (2003). Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the luxS quorum-sensing system. *Mol Microbiol.* 48, 1647-1664.
- Lee BC, Kim SH, Choi SH, Kim TS. (2005). Induction of interleukin-8 production via nuclear factor-kb activation in human intestinal epithelial cells infected with *Vibrio vulnificus*. *Immunol.* 115, 506-515.
- Leng F, Liz S, Wu W, Zhang J, Song J, Zhong M. (2019). Epidemiology, pathogenetic mechanism, clinical characteristics, and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: A case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 38, 1999-2004.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25, 402-408.
- Oliver JD. (2005). Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect.* 133, 383-391.
- Park JW, Ma SN, Song ES, Song CH, Chae MR, Park BH, Rho RW, Park SD, Kim HR. (1996). Pulmonary damage by *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Infect Immun.* 64, 2873-2876.
- Senoh M, Miyoshi SI, Okamoto K, Fouz B, Amaro C, Shinoda S. (2005). The cytotoxin-hemolysin genes of human and eel pathogenic *Vibrio vulnificus* strains: Comparison of nucleotide sequences and application to the genetic grouping. *Microbiol Immunol.* 49, 513-519.
- Starks AM, Bourdage KL, Thiaville PC, Gulig PA. (2006). Use of a marker plasmid to examine differential rates of growth and death between clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in experimentally infected mice. *Mol Microbiol.* 61, 310-323.
- Wright AC, Morris JG. (1991). The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect Immun.* 59, 192-197.



Frequency of *Staphylococcus pseudintermedius* in canine skin infections and antibiotic resistance profiles of the recovered isolates

İnci Başak Müştak^{1*}, Hamit Kaan Müştak², Seyyide Sarıçam³, Tuğçe Üstün⁴, Asena Esra Erdem⁵

^{1,2,3,4,5} Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 13.09.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 27.10.2020

Abstract: In this study, 61 *Staphylococcus pseudintermedius* strains were isolated from 77 dogs with skin infections. Antimicrobial resistance to commonly used antibiotics was evaluated by the disc diffusion method. The presence of the *blaZ* and *mecA* genes responsible respectively for penicillin and methicillin resistance was investigated by PCR. The *S. pseudintermedius* isolates were highly resistant to tetracycline (47.5%) and penicillin (40.9%) while all isolates were susceptible to amikacin (100%). All 18 methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) strains were positive for the *mecA* gene while the 25 *S. pseudintermedius* strain isolates with the *blaZ* gene were also resistant to penicillin phenotypically. Of the 18 MRSP isolates, 14 *S. pseudintermedius* strains were resistant to three or more antibiotics, indicating that these strains showed multiple drug resistance (MDR). This report confirms previous findings that *S. pseudintermedius* is the most frequently isolated bacteria from dog skin infections. It can also be concluded that amikacin is a useful agent for treating *S. pseudintermedius* infections since all the *S. pseudintermedius* strains tested in this study were susceptible to amikacin.

Keywords: Dogs, methicillin resistance, *staphylococcus pseudintermedius*

Köpek deri enfeksiyonlarında *Staphylococcus pseudintermedius* sıklığı ve elde edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri

Özet: Bu çalışmada, deri enfeksiyonu olan 77 köpekten 61 *Staphylococcus pseudintermedius* suşu izole edilmiştir. Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direnç, disk difüzyon yöntemi ile değerlendirildi. Penisilin ve metisilin direncinden sorumlu sırasıyla *blaZ* ve *mecA* genlerinin varlığı PCR ile araştırıldı. *S. pseudintermedius* izolatları tetrasiklin (% 47.5) ve penisiline (% 40.9) yüksek direnç gösterirken, tüm izolatlar amikasinine (% 100) duyarlıydı. 18 metisiline dirençli *S. pseudintermedius* (MRSP) suşunun tümü *mecA* geni için pozitif iken *blaZ* genine sahip 25 *S. pseudintermedius* suşu izolatu da fenotipik olarak penisiline dirençliydi. 18 MRSP izolatından 14 *S. pseudintermedius* suşu, üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençliydi, bu da bu suşların çoklu ilaç direnci (MDR) gösterdiğini ortaya koydu. Bu rapor, *S. pseudintermedius*'ün köpek deri enfeksiyonlarından en sık izole edilen bakteri olduğuna dair önceki bulguları doğrulamaktadır. Bu çalışmada test edilen tüm *S. pseudintermedius* suşları amikasinine duyarlı olduğundan, amikasinin *S. pseudintermedius* enfeksiyonlarının tedavisinde yararlı bir ajan olduğu sonucuna varılabilir.

Anahtar kelimeler: Köpek, metisilin direnci, *staphylococcus pseudintermedius*

Introduction

Staphylococcus pseudintermedius is a coagulase-positive staphylococcal species described in 2005 as a distinct species from *Staphylococcus intermedius* (Devriese et al. 2005). It is classified in the *Staphylococcus intermedius* group (SIG), which comprises *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* and *S. delphini* (Devriese et al. 2005; Sasaki et al. 2007a; Sasaki et al. 2007b).

S. pseudintermedius is an opportunistic pathogen that colonizes the skin and mucosal surfaces in cats and dogs (Devriese et al. 2005; Rubin and Chirino-Trejo 2011; Bannoehr and Guardabassi 2012). *S. pseudintermedius* also causes clinical infections, such as canine pyoderma, otitis externa, and

nosocomial infections (Ball et al. 2008; van Duijkeren et al. 2011). *S. pseudintermedius* causes more than 90% of canine pyoderma cases (Kawakami et al. 2010; Yoon et al. 2010). Although this organism is associated with skin infections in dogs, human cases have also been described, especially among dog owners after contact with them (Van Hoovels et al. 2006; Chuang et al. 2010; Stegmann et al. 2010; Savini et al. 2013; Somayaji et al. 2016). Since the first report of human transmission of this pathogen, it has been accepted as a critical public health concern (Van Hoovels et al. 2006).

Since *S. intermedius*, *S. delphini* and *S. pseudintermedius* resemble each other phenotypically, classical biochemical tests are neither reliable nor sufficient for discriminating *Staphylococcus intermedius*

Yazışma adresi / Correspondence: İnci Başak Müştak, İrfan Baştuğ Cad. Dışkapı-Ankara E-mail: inciibasak@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-9180-5768 • ²0000-0002-3694-1959 • ³0000-0002-2386-6857 • ⁴0000-0002-1711-5520 • ⁵0000-0001-7650-7762

group (SIG) members (Sasaki et al. 2007b; Bond and Loeffler 2012). Many methods used to discriminate *S. pseudintermedius* from other SIG members, such as restriction with certain enzymes of the house-keeping *pta* gene and *nuc* gene by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), the *hsp60* gene, 16S rDNA sequences, and the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (El Zubeir et al. 2007; Sasaki et al. 2007b; Bannoehr et al. 2009). The sequence analysis of the RNA polymerase B (*rpoB*) gene has been used to discriminate staphylococcal species and subspecies. This method is also recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for identifying *S. pseudintermedius* (Mellmann et al. 2006; Petti and Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

Antibiotic resistance is a great challenge in treating both human and animal infections worldwide (Bannoehr and Guardabassi 2012). According to the literature, *S. pseudintermedius* remains susceptible to antibiotics, although there has been a dramatic increase in resistance to methicillin since 2006 (van Duijkeren et al. 2011; Moodley et al. 2014). Detection of methicillin resistance in *S. pseudintermedius* (MRSP) by the determination of the *mecA* gene has become a "gold standard" method (Geha et al. 1994; Chambers 1997). This gene encodes a penicillin-binding protein 2a/2' (PBP2a/PBP2'), which has a lower affinity to all beta-lactam group antibiotics. It, therefore, causes resistance to all beta-lactam and beta-lactam derivative antibiotics (Felten et al. 2002; Velasco et al. 2005; Bosgelmez-Tinaz et al. 2006; Zhu et al. 2006; Perez et al. 2007).

Beside this, beta-lactam antibiotics such as penicillin have been used in staphylococcal infections in both humans and animals. Penicillin-resistant staphylococci are the most commonly isolated strains reported in dogs and cats (Fuda et al. 2005; Malik et al. 2007). Penicillin resistance in staphylococci is mainly caused by the *blaZ* gene, which is similar to the *mecA* gene. It encodes beta-lactamases and is considered to mediate methicillin resistance (Zscheck and Murray 1993; Rosato et al. 2003). Recently, there have been reports of multi-antimicrobial resistance in *S. pseudintermedius* (Bannoehr and Guardabassi 2012; De Lucia et al. 2012; Murugaiyan et al. 2014).

The present study aimed to determine the presence of MRSP strains and the multiple drug res-

sistance (MDR) profile of *S. pseudintermedius* strains isolated from skin infections of dogs.

Materials and Methods

Isolation and identification

This study used 68 staphylococcal isolates obtained from swab samples taken from 77 dogs diagnosed with skin infections in an animal hospital in Ankara University and submitted to the Department of Microbiology between 2014 and 2018. All the staphylococcal isolates were subjected to standard microbiological procedures. After incubation on blood agar containing 5-7% ovine blood at 37°C for 24h, Gram staining, catalase test, DNase test, and coagulase test were performed. Microbact™ Staph 12S system (Staphylococcal 12S Identification System, MB1561, Oxoid) was used for further phenotypic identification.

Molecular identification of *S. pseudintermedius* isolates

For this purpose, the sequence analysis of the *rpoB* gene was performed (CLSI 2018). Briefly, the total volume of 25 µl PCR mix consisted of 3 mM MgCl₂ (Thermo Fischer Scientific, USA), 0.2 mM dNTPs (10 mM dNTP mix; Thermo Fischer Scientific, USA), 0.2 µM of each primer, 2.5 µl PCR reaction buffer, 2U Taq DNA polymerase (Thermo Fischer Scientific, USA) and 2 µl template DNA. The PCR amplification conditions were as follows: 94°C for 3 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 s, 72°C for 1 min, and 72°C for 7 min. *S. pseudintermedius* strain obtained from Dr. Ken Kikuchi (Department of Infection Control Science, Faculty of Medicine Juntendo University, Tokyo, Japan) was used as a positive control in all phenotypic and genotypic tests.

After amplification, the PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen). For the sequence analysis, BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) was used according to the manufacturer's instructions. Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) was used for purifying the amplicons while the sequence analysis was performed in an Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). CLC Main Workbench software version 7 was used for analyzing sequences. The primers used for the amplification and sequencing of the *rpoB* gene are shown in Table 1 (Drancourt et al. 2004).

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of the *rpoB* gene.

	Primer Sequences	Product	References
31F	F 5'- GCCTTAGGACCTGGTGGTTT-3'	800 bp	Drancourt, 2004
830R	R 5'- GTTGTAACCTTCCAWGTCAT-3'		

Antimicrobial Susceptibility Tests

The antimicrobial susceptibility test was performed by disc diffusion following the recommendations of CLSI. Discs known to be used in veterinary medicine worldwide were chosen and used as follows: amikacin (AK: 30 µg); amoxicillin-clavulanic acid (AMC: 30 µg); chloramphenicol (C: 30 µg); ciprofloxacin (CIP: 5 µg); erythromycin (E: 15 µg); gentamicin (GM: 10 µg); kanamycin (K: 30 µg); neomycin (N: 10 µg); penicillin (P: 10 µg); streptomycin (S: 10 µg); tetracycline (TE: 30 µg); trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT: 5 µg). For the methicillin resistance, oxacillin (OX: 1 µg) disc was used according to CLSI guidelines.

PCR Amplification of Methicillin and Penicillin Resistance Genes

Methicillin and penicillin resistance genes were investigated by detecting the *mecA* and *blaZ* genes described by Strommenger et al. (2003) and Martineau et al. (2000), respectively. PCR amplification was performed containing 0.2 µM of each primer, 0.2 mM dNTPs (10 mM dNTP mix; Thermo Fisher Scientific, USA), 3 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 2.5 µL PCR reaction buffer, 2U Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific; EP0402), 2 µL of DNA as a template and nuclease-free water to produce a final volume of 25 µL. PCR conditions were as follows: strand separation at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1

min, 72°C for 1 min, and 7 min at 72°C for further strand extension.

Results

A total of 61 isolates from 68 staphylococcal isolates were identified as *S. pseudintermedius* by both biochemical and sequence analysis of the *rpoB* gene while 7 isolates of 68 staphylococcal isolates were identified as *Staphylococcus delphini*.

The antimicrobial susceptibility of the 61 isolates is shown in Table 2. The lowest antibiotic resistance was observed for amikacin, gentamycin, and chloramphenicol whereas the highest resistance was observed for tetracycline and penicillin. The isolates that were resistant to at least three antibiotics were considered MDR isolates. According to CLSI guidelines, 25 *S. pseudintermedius* strains showed an MDR phenotype, 18 *S. pseudintermedius* strains had an MRSP phenotype, while 14 *S. pseudintermedius* strains had both MDR and MRSP phenotypes (Table 3). Beside this, 25 *S. pseudintermedius* strains were resistant to penicillin.

The *mecA* and *blaZ* genes were also observed in 18 and 25 strains, respectively, which indicates that these isolates were *mecA*-mediated MRSP isolates (Bemis et al. 2006). In addition, all MRSP isolates showed high antibiotic resistance (77.7%), except for amikacin. All the penicillin-resistant strains except for one showed an MDR phenotype.

Table 2. Antimicrobial susceptibility of the 61 *S. pseudintermedius* isolates.

Antimicrobial agent	Number of isolates (%)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	61 (100)	0 (0)	0 (0)
Amoxicillin-clavulanic acid	39 (63.9)	0 (0)	22 (36)
Chloramphenicol	50 (81.9)	0 (0)	11 (18)
Ciprofloxacin	47 (77)	0 (0)	14 (22.9)
Erythromycin	35 (57.3)	4 (6.5)	22 (36)
Gentamicin	50 (81.9)	4 (6.5)	7 (11.4)
Kanamycin	38 (62.2)	0 (0)	23 (37.7)
Neomycin	29 (47.5)	11 (18)	21 (34.4)
Oxacillin	37 (60.6)	6 (9.8)	18 (29.5)
Penicillin	36 (59)	0 (0)	25 (40.9)
Streptomycin	39 (63.9)	0 (0)	22 (36)
Tetracycline	32 (52.4)	0 (0)	29 (47.5)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	47 (77)	0 (0)	14 (22.9)

Table 3. Antimicrobial susceptibility of the 18 MRSP isolates.

Antimicrobial agent	Number of isolates		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	18	0	0
Amoxicillin-clavulanic acid	8	0	10
Chloramphenicol	15	0	3
Ciprofloxacin	4	0	14
Erythromycin	5	0	13
Gentamicin	14	0	4
Kanamycin	4	0	14
Neomycin	7	0	11
Penicillin	4	0	14
Streptomycin	4	0	13
Tetracycline	5	0	14
Trimethoprim-sulfamethoxazole	4	0	14

Discussion

In this study, the isolation rate of *S. pseudintermedius* was high for all staphylococcal isolates. Of the 68 staphylococcal isolates, 61 were *S. pseudintermedius*, of which 25 were MDR and 18 were MRSP. On the other hand, 18 strains of the isolates were *mecA* positive while 25 were *blaZ* positive by PCR.

S. pseudintermedius was detected in 89.7% of the dogs with skin infections by *rpoB* gene sequencing. This high isolation rate was also observed in previous studies (Kawakami et al. 2010; Bannoehr and Guardabassi 2012). Onuma et al. (2012) reported *S. pseudintermedius* isolation rates of 76% in dogs with pyoderma while Saputra et al. (2017) reported 70%. Although the comparison between different studies cannot be made easily due to the differences in the geographical region, sample type, and identification methods, these results indicate that *S. pseudintermedius* is the major causative agent of canine skin infections. In Turkey, the rate of *S. pseudintermedius* based on RFLP was 82.2% in healthy dogs and 80.4% in dogs with skin infections (Sareyyupoglu et al. 2014; Findik et al. 2018). Ozturk et al. (2010) identified *Staphylococcus* species in dogs with otitis externa, skin wounds and pyoderma. Nevertheless none of them was *S. pseudintermedius*. They isolated 19.1%, 9.7%, 7.7% *S. intermedius* in dogs with otitis externa, skin wounds, and pyoderma, respectively. However, they used 16S rRNA sequencing for identifying *Staphylococcus* species, which is not recommended by CLSI for discriminating between *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. delphini*. Thus, they may not have been able to identify *S. pseudintermedius* within the SIG group.

Methicillin-resistant *S. pseudintermedius* has been reported in companion animals (Ruscher et al. 2010; Weese and van Duijkeren 2010). MRSP isolation rates of 2-7% have also been reported in various European countries, even in healthy dogs (De Lucia et al. 2011; Gomez-Sanz et al. 2011; Nienhoff et al. 2011). In 2019, the proportion of MRSP isolates among clinical samples was 9.3% in one Central European setting (Krapf et al. 2019). In contrast, MRSP isolation rates of 47-66% have been reported in Asian countries (Kawakami et al. 2010; Feng et al. 2012; Bardiau et al. 2013). Turkey has only limited recent data on the frequency of MRSP isolates from canine samples. The frequency of MRSP strains in this study was lower than in Asia but higher than in Europe. The rate of MRSP isolates in the present study was also lower than in a previous study in Turkey (Sareyyupoglu et al. 2014), who reported *S. pseudintermedius* frequencies of 33.3% in shelter dogs with dermatitis. In the present study, 18 isolates were MRSP (29.5%). This decrease in MRSP rates between the two studies can be explained by new regulations that strictly control and restrict antibiotic usage in animals in Turkey.

Multidrug resistance in *S. pseudintermedius* has been reported and is a major concern in Europe. In Germany, Loeffler et al. (2007) reported that 23% of *S. pseudintermedius* isolates were MDR while Findik et al. (2018) reported 13.04% MDR *S. pseudintermedius* strains isolated from healthy dogs in Turkey. In the present study, the MDR *S. pseudintermedius* isolation rate was 40.9% in dogs with skin infections whereas Findik et al. (2018) found no MDR-MRSP isolates in healthy dogs. Menandro et al. (2019) re-

ported that all MRSP isolates (31.6%) in their study were MDR in dogs with pyoderma, conjunctivitis, otitis, or urinary tract or bone infections. In the present study, we detected 22.9% MDR-MRSP. This high level of MDR in MRSP isolates indicates that MRSP isolates usually have an MDR profile. The difference in MDR and MDR-MRSP rates may be due to differences in the animals' health condition. Finally, the identification of isolates only susceptible to amikacin reflects the limited use of amikacin in veterinary practice.

In conclusion, the high frequency of MRSP isolates in dogs in Turkey constitutes a risk for public health. However, restricting the usage of antibiotics decreases antibiotic resistance in *S. pseudintermedius* strains. Comprehensive monitoring is needed to understand the epidemiology of this pathogen and the current status of antibiotic resistance in other *Staphylococci*.

Conflict of interest

Declaration of interest: N/A

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Ball KR, Rubin JE, Chirino-Trejo M, Dowling PM. (2008) Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. *Can Vet J.* 49(10), 985-990.
- Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. (2009) Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol.* 47(2), 469-471.
- Bannoehr J, Guardabassi L. (2012) *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol.* 23(4), 253-E252.
- Bardiau M, Yamazaki K, Ote I, Misawa N, Mainil JG. (2013) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Microbiol Immunol.* 57(7), 496-501.
- Bemis DA, Jones RD, Hiatt LE, Ofori ED, Rohrbach BW, Frank LA, Kania SA. (2006) Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J Clin Microbiol.* 44(9), 3374-3376.
- Bond R, Loeffler A. (2012) What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J Small Anim Pract.* 53(3), 147-154.
- Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Aridogan B, Coskun-Ari F. (2006) Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical laboratory utility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 25(6), 410-412.
- Chambers HF. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 10(4), 781-791.
- Chuang CY, Yang YL, Hsueh PR, Lee PI. (2010) Catheter-Related Bacteremia Caused by *Staphylococcus pseudintermedius* Refractory to Antibiotic-Lock Therapy in a Hemophilic Child with Dog Exposure. *J Clin Microbiol.* 48(4), 1497-1498.
- CLSI. (2018) Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline. In: Institute CaLS, ed. *CLSI document MM18-A*. Wayne, PA ABD.
- CLSI. (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. *CLSI supplement M100*. Wayne, PA ABD.
- De Lucia M, Moodley A, Latronico F, Giordano A, Caldin M, Fondati A, Guardabassi L. (2011) Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. *Res Vet Sci.* 91(3), 346-348.
- Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(4), 1569-1573.
- Drancourt M, Roux V, Fournier PE, Raoult D. (2004) rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol.* 42(2), 497-504.
- El Zubeir IEM, Kanbar T, Alber J, Lammler C, Akineden O, Weiss R, Zschock M. (2007) Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. *Vet Microbiol.* 121(1-2), 170-176.
- Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. (2002) Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 40(8), 2766-2771.
- Feng YY, Tian W, Lin DC, Luo QY, Zhou YZ, Yang T, Deng YT, Liu YH, Liu JH. (2012) Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Vet Microbiol.* 160(3-4), 517-524.
- Findik A, Ciftci A, Onyay T, Sezener MG, Kocak Y, Gulhan T. (2018) Determination of methicillin resistance and some genotypic characteristics of staphylococci isolated from dogs and their owners. *Turk J Vet Anim Sci.* 42(6), 549-555.
- Fuda CC, Fisher JF, Mobashery S. (2005) Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci.* 62(22), 2617-2633.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH. (1994) Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 32(7), 1768-1772.
- Gomez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Saenz Y, Zarazaga M. (2011) Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34(5), 447-453.
- Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T. (2010) Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. *J Vet Med Sci.* 72(12), 1615-1619.
- Krapf M, Muller E, Reissig A, Slickers P, Braun SD, Muller E, Ehrlich R, Monecke S. (2019) Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs

- and the description of their SCCmec elements. *Vet Microbiol.* 233, 196-203.
- Malik S, Christensen H, Peng H, Barton MD. (2007) Presence and diversity of the beta-lactamase gene in cat and dog staphylococci. *Vet Microbiol.* 123(1-3), 162-168.
- Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. (2000) Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. *J Antimicrob Chemother.* 46(4), 527-534.
- Mellmann A, Becker K, Von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. (2006) Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis.* 12(2), 333-336.
- Moodley A, Damborg P, Nielsen SS. (2014) Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Vet Microbiol.* 171(3-4), 337-341.
- Murugaiyan J, Wlther B, Stamm I, Abou-Elnaga Y, Brueggemann-Schwarze S, Vincze S, Wieler LH, Lübke-Becker A, Semmler T, Roesler U. (2014) Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clin Microbiol Infect.* 20, 1007-1015.
- Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Kreienbrock L, Schwarz S, Simon D, Nolte I. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. *Vet Microbiol.* 150(1-2), 191-197.
- Ozturk D, Avki S, Turutoglu H, Yigitarlan K, Sagnak S. (2010) Methicillin Resistance Among Coagulase-positive Staphylococci Isolated from Dogs with Otitis Externa, Skin Wounds and Pyoderma. *Kafkas Uni Vet Fak Derg.* 16(4), 651-656.
- Onuma K, Tanabe T, Sato H. (2012) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Vet Dermatol.* 23, 17-22, e15.
- Perez LR, Antunes AL, Barth AL, D'azevedo PA. (2007) Variations of agar screen tests for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26(4), 267-270.
- Petti CA, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) *Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing : approved guideline*, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Rosato AE, Kreiswirth BN, Craig WA, Eisner W, Climo MW, Archer GL. (2003) *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents and Chemother.* 47(4), 1460-1463.
- Rubin JE, Chirino-Trejo M. (2011) Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J Vet Diagn Invest.* 23(2), 351-354.
- Ruscher C, Lubke-Becker A, Semmler T, Wleklinski CG, Paasch A, Soba A, Stamm I, Kopp P, Wieler LH, Walther B. (2010) Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Vet Microbiol.* 144(3-4), 340-346.
- Saputra S, Jordan D, Worthing KA, Norris JM, Wong HS, Abraham R, Trott DJ, Abraham S. (2017) Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: A one year study. *Plos One.* 12(4), e0176379.
- Sareyyupoglu B, Mustak HK, Cantekin Z, Diker KS. (2014) Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Shelter Dogs in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 20(3), 435-438.
- Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. (2007a) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J Clin Microbiol.* 45(4), 1118-1125.
- Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. (2007b) Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol.* 45(9), 2770-2778.
- Savini V, Barbarini D, Polakowska K, Gherardi G, Bialecka A, Kasprowicz A, Polilli E, Marrollo R, Di Bonaventura G, Fazii P, D'antonio D, Miedzobrodzki J, Carretto E. (2013) Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Bone Marrow Transplant Recipient. *J Clin Microbiol.* 51(5), 1636-1638.
- Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Church D. (2016) Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Microb and Infect Dis.* 85(4), 471-476.
- Stegmann R, Burnens A, Maranta CA, Perreten V. (2010) Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *J Antimicrob Chemot.* 65(9), 2047-2048.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 41(9), 4089-4094.
- Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyoralá S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Torneke K, Antimicrobials SAG. (2011) Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemot.* 66(12), 2705-2714.
- Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. (2006) First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol.* 44(12), 4609-4612.
- Velasco D, Del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. (2005) Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemot.* 55(3), 379-382.
- Weese JS, Van Duijkeren E. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 140(3-4), 418-429.
- Yoon JW, Lee KJ, Lee SY, Chae MJ, Park JK, Yoo JH, Park HM. (2010) Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea. *J Microbiol Biotechnol.* 20(12), 1764-1768.
- Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J. (2006) Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect.* 12(10), 1039-1042.
- Zscheck KK, Murray BE. (1993) Genes Involved in the Regulation of Beta-Lactamase Production in Enterococci and Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(9), 1966-1970.



Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle using MIRU-VNTR analysis

Yasin Gülcü^{1*}, Hasan Hüseyin Hadimli²

¹Konya Veterinary Control Institute, Meram, Konya, Turkey

²Selçuk University, Veterinary Faculty, Microbiology Department, 42075, Selçuklu, Konya, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 03.11.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 17.11.2020

Abstract: Bovine tuberculosis, as a significant threat to both animal and human health, is a common global zoonotic disease. The emergence of molecular epidemiology has made it possible to gain a better understanding of the dynamics of disease transmission, and consequently, to come up with more effective control methods. The present study seeks to identify *Mycobacterium bovis* isolates in our region at a genotype level. To this end, the molecular epidemiological characteristics of *Mycobacterium bovis* strains isolated using classical methods and identified using molecular methods from the tissues and organs of cattle with suspected tuberculosis, obtained from slaughterhouses in the Konya province, or from those sent to Konya Veterinary Control Institute, were determined through genotyping. In the analysis of a total of 70 *Mycobacterium bovis* isolates, carried out using the MIRU-VNTR method, it was found that the repeat numbers for MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27, and MIRU39 loci did not vary between strains, while the repeat numbers for MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU31, and MIRU40 loci varied between strains and had a high discriminatory power ($0.25 \leq h$). It was further observed that 29 subgroups between 1-14 isolates formed. The movement of animals in our region, which occurs for several reasons, is considered to cause *Mycobacterium bovis* strains to vary between herds, and the fact that the cattle from which the isolates were sourced for our study came from different herds was considered to cause a variation in the discriminatory power in the MIRU loci.

Keywords : Bovine tuberculosis, MIRU-VNTR, molecular typing, *Mycobacterium bovis*.

Sığırlardan izole edilen *Mycobacterium bovis* izolatlarının MIRU-VNTR analizi ile tiplendirilmesi

Özet: Sadece hayvan sağlığı değil aynı zamanda halk sağlığı açısından da önem arz eden sığır tüberkülozu, dünya genelinde yaygın olan zoonotik bir hastalıktır. Moleküler epidemiyolojinin ortaya çıkışıyla, hastalığın yayılma dinamiğinin anlaşılması ve daha etkili mücadele yöntemlerinin geliştirilebilmesinin temelleri atılmıştır. Ancak, sığır tüberkülozunun moleküler epidemiyolojisine yönelik, ülkemizde yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Bu çalışmada, bölgemizdeki *Mycobacterium bovis* izolatlarının genotip düzeyinde tanımlanması amaçlandı. Çalışmada, Konya'daki kesimhanelerden alınan ya da Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne teşhis için gönderilen tüberküloz şüpheli sığır doku ve organlarından klasik metotlarla izole edilen ve moleküler metotlar ile tanımlanan *M. bovis* suşlarının genotiplendirilmesi sonucu moleküler epidemiyolojik özellikleri belirlendi. Toplam 70 *M. bovis* izolatının, MIRU-VNTR yöntemi ile yapılan analizi sonucu; MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27 ve MIRU39 lokuslarındaki tekrar sayılarının suşlar arasında farklılık göstermediği; MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40 lokuslarındaki tekrar sayılarının ise suşlar arasında farklılık gösterdiği ve yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ($0.25 \leq h$) ortaya konuldu. Ayrıca, izolat sayısı 1-14 arasında değişen 29 altgrup oluştuğu görüldü. Bölgemizde farklı sebepler ile yaşanan hayvan hareketliliğinin, *M. bovis* suşlarının sürüler arasında farklılık göstermesine, çalışmamızda ki izolatların kaynağı olan sığırların da farklı sürülere ait olmasının MIRU lokuslarında ayırım gücü çeşitliliğinin ortaya çıkmasına neden olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: MIRU-VNTR, *Mycobacterium bovis*, moleküler tiplendirme, sığır tüberkülozu

Introduction

Mycobacterium bovis, as the main causative agent of bovine tuberculosis, is a zoonotic bacterium that also causes tuberculosis in many domestic and wild mammalian species, aside from in humans (Joen et al. 2008; Boleda-Martinez et al. 2015). In addition to being a significant global animal health concern, the disease affects animal production and interna-

tional trade, and more importantly, threatens public health (Wedlock et al. 2002; Duarte et al. 2010). For this reason, the diagnosis of bovine tuberculosis is not only valuable for the prevention of the transmission of the disease among animals, but also for the prevention of transmission from animals to humans. For the control of the disease, the molecular characterization of the strains that circulate in the field is

important (Joen et al. 2008). Classical bacteriological methods are important for the identification of the agent in the sample but are insufficient for the characterization of the strains (Boledo-Martinez et al. 2015). For this reason, the genotyping methods used for the clinical strains are considered valuable molecular tools for the epidemiology of the disease, as well as for control studies (Matos et al. 2010). The use of these methods allows the identification of the most common *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) genotypes in a region, permits the monitoring and control of the occurrence of multiple disease foci, and increases the effectiveness of disease control programs (Carvalho et al. 2016).

The first gene region that is used to identify the similarities or differences in the distribution of *Mycobacterium* strains is IS6110, although this method is insufficient when there is a need to type a large number of strains, requiring intensive labor. Spacer oligonucleotide typing (spoligotyping) and Variable Number Tandem Repeats of *Mycobacterium* Interspersed Repetitive Units (MIRU-VNTR) analyses offer a good alternative approach to the characterization of a high number of strains, giving faster results than IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism (Köksalan 2010).

Forty one different VNTR regions are present within the genomes of the complex members of *M. tuberculosis*, and vary between 50-100 bp are defined as MIRU. The sizes of bands that are determined using the primers that include MIRU regions and that recognize neighboring regions permit the determination of repeat numbers of MIRU locus. Afterward, the VNTR profile of each strain is obtained based on the numerical coding that is carried out using the copy numbers. While 12 loci MIRU primers were used in the epidemiological studies in the past, MIRU sets comprising 15 and 24 loci were used in later studies (Supply et al. 2006; Boledo-Martinez et al. 2015).

With the emergence of molecular epidemiology, faster and more reliable diagnostic methods were developed that provided information about the relationships between the strains as well as the genetic structure. MIRU-VNTR is a molecular tool that makes use of fast, objective, and high-resolution monitoring procedures for the identification of outbreak dynamics and epidemiology (Vargas et al. 2016). The goal of the present study is to determine the epidemiological characteristics of the clinical isolates of *M. bovis* in Konya province at a molecular level.

Materials and Method

Bacterial strains used in the study

For the present study, *M. bovis* strains that were isolated and identified using classical and molecular methods from the tissues and organs of 70 tuberculosis-suspected cattle obtained from slaughterhouses in Konya province, or samples sent to the Konya Veterinary Control Institute, were tested using 12 loci MIRU-VNTR to investigate their molecular epidemiological characteristics.

DNA Extraction

The DNA extraction of the mycobacteria that were isolated from the tuberculosis-suspected tissues and organs was performed using a DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN-69506, Germany), following the instructions of the manufacturer.

MIRU-VNTR Analysis

The primers given in Table 1. were used in the targeted MIRU loci of *M. bovis* (02, 04, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40). PCR was performed to determine the VNTR number of the 21 MIRU loci specific to each strain (Oral Zeytinli and Köksal 2012). The PCR mixture was prepared to include: 0.25 µl DMSO (Sigma), 2×PCR mixture (Fermentas), 3.125 µl [4mM MgCl₂, 1.6 mM dNTP mix (0.4 mM from each dNTP) containing 0.05 µl Taq DNA polimerase], "forward" primer 0.040 µl, "reverse" primer 0.040 µl, DNA 0.625 µl and dH₂O 2.170 µl, totaling 6.250 µl.

Table 1. Primers used for the 12-Locus MIRU VNTR method.

Target Gene	Sequence of PCR primer (5' to 3')
MIRU 2a	5'-TGG ACT TGC AGC AAT GGA CCA ACT-3'
MIRU 2b	5'-TAC TCG GAC GCC GGC TCA AAA T-3'
MIRU 4a	5'-GCG CGA GAG CCC GAA CTG C-3'
MIRU 4b	5'-GCG CAG CAG AAA CGT CAG C-3'
MIRU 10a	5'-GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC-3'
MIRU 10b	5'-GCC ATT TTG GTG ATC AGC TAC CT-3'
MIRU 16a	5'-TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A-3'
MIRU 16b	5'-CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC-3'
MIRU 20a	5'-TCG GAG AGA TGC CCT TCG AGT TAG-3'
MIRU 20b	5'-GGA GAC CGC GAC CAG GTA CTT GTA-3'
MIRU 23a	5'-CAG CGA AAC GAA CTG TGC TAT CAC-3'
MIRU 23b	5'-CGT GTC CGA GCA GAA AAG GGT AT-3'
MIRU 24a	5'-CGA CCA AGA TGT GCA GGA ATA CAT-3'
MIRU 24b	5'-GGG CGA GTT GAG CTC ACA GAA-3'
MIRU 26a	5'-CCC GCC TTC GAA ACG TCG CT-3'
MIRU 26b	5'-TGG ACA TAG GCG ACC AGG CGA ATA-3'
MIRU 27a	5'-TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA-3'
MIRU 27b	5'-GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A-3'
MIRU 31a	5'-ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA-3'
MIRU 31b	5'-GTG CCG ACG TGG TCT TGA T-3'
MIRU 39a	5'-CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC-3'
MIRU 39b	5'-CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT-3'
MIRU 40a	5'-GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T-3'
MIRU 40b	5'-GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA-3'

Amplification was performed in a thermal cycler (MJ Research PTC-100 USA) by preliminary denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 secs, cooling at 62°C for 1 min, extension at 72°C for 1.5 mins, and a final chain extension at 72°C for 10 mins. The amplicons were subjected to gel electrophoresis in 2% agarose with ethidium bromide (Seakem, 50002, USA) at 120 volts for 60 minutes. After electrophoresis, the gel was monitored using a system (EC App. Corp. EC135 USA), and then 50-1000 bp markers (Fermentas) were used for the determination of band size (Oral Zeytinli and Köksal 2012).

Table 2. Copy numbers and discriminatory power determined using 12-locus MIRU VNTR method.

Allel	Allel Copy Numbers**												Discriminatory power (h*)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
MIRU 2	70												0,00
MIRU 4	70												0,00
MIRU 10	40	1				7	19	3					0,58
MIRU 16			41	29									0,48
MIRU 20	70												0,00
MIRU 23					70								0,00
MIRU 24	70												0,00
MIRU 26						10	5	38	17				0,60
MIRU 27				70									0,00
MIRU 31		29	19			22							0,65
MIRU 39	70												0,00
MIRU 40	5	58	7										0,29

* $h=1-\sum x_i^2/[n(n-1)]$

**xi: repeats of the allele locus

Results

In the study, in which 12 loci MIRU-VNTR was used to investigate the molecular epidemiological characteristics of 70 cattle isolates that were isolated and identified using classical and molecular methods, it was found that the repeat numbers for MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU31, and MIRU40 loci varied between strains and these loci had a discriminatory power ($0.25 \leq h$) [MIRU-VNTRPlus, www.miru-vntrplus.org].

It was also found that the repeat numbers for MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27, and MIRU39 loci showed no variation between the strains and had no discriminatory power. It was determined from the genotyping analysis that 29 subgroups with 1-14 isolates were formed; that subgroup 16 comprised the largest gene group, with

13 members, followed by subgroup 18 with eight members and subgroup 17 with five members, while one subgroup had four members, three subgroups had three members, eight subgroups had two members and 14 subgroups had one member.

Table 3. VNTR profiles formed as a result of the MIRU-VNTR analysis of cattle isolates.

MIRU-VNTR Profiles	Strain number
232324274222	13
236424274522	8
235424274522	5
232324254323	4
236324284522	3
236424284522	3
237424274322	3
236324284322	2
232324254221	2
232324274221	2
232324254322	2
232324274223	2
232324284322	2
232324284522	2
232324284222	2
232324264222	1
232324254222	1
232324284222	1
232324264522	1
232424274322	1
232424254322	1
232424274222	1
232424274223	1
232424264222	1
233324264322	1
235324284222	1
235424284322	1
236324274221	1
236424264322	1
236424274322	1
N=70	

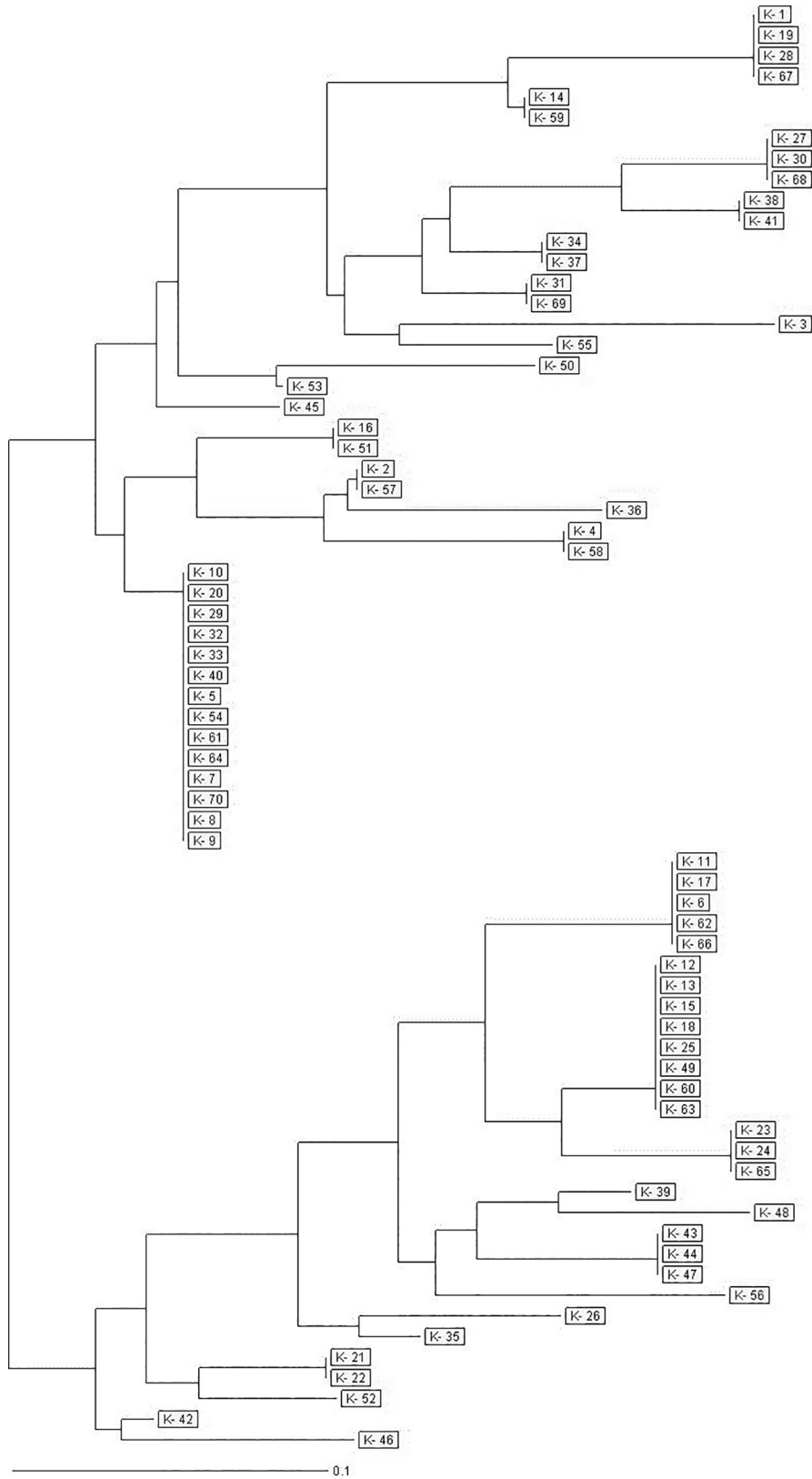


Figure 1. 12 MIRU-VNTR dendrogram of 70 cattle isolates.

Discussion

Genotyping studies of *M. bovis* strains are considered a valuable tool for the identification of sources of infection and transmission routes, and for the epidemiological monitoring of bovine tuberculosis (Boniotti et al. 2009). The lack of information or epidemiological assessments are the main reasons for the failure to isolate the agent in many tuberculosis cases (Frothingham and Meeker-O'Connell 1998). Thanks to the epidemiological studies that are increasing in number with the development of molecular methods, the distinction between reinfection and reactivation, in particular, can be made, with the source and dynamics of outbreaks can be determined, and iatrogenic infections and laboratory contaminations can be detected (Esen 2003). Genotyping studies are not only effective for regional backwards tracing, but also for the global comparison of tuberculosis isolates (Yang et al. 2015). The IS6110 REA (Restriction Enzyme Analysis) and/or PGRS (Polymorphic GC Rich Sequence) methods used in these studies have recently been replaced by such methods as spoligotyping and MIRU-VNTR (Esen 2003).

For the typing of *M. bovis* isolates, the importance of MIRU-VNTR (a PCR-based method that allows the locus analysis of 12 independent loci after amplification) in genotyping has been proven in previous studies, while there is as yet no internationally accepted MIRU-VNTR panel for *M. bovis*. The fact that each locus shows allelic diversity between countries makes the detection and use of a standardized locus panel important for future comparisons between laboratories (Bolado-Martínez et al. 2015). The most significant advantages of MIRU-VNTR are its high discriminatory power and repeatability, its suitability for multi-center studies, its lack of a requirement for large amounts of DNA, and its ability to be performed easily and in vitro (Esen 2003; Oral Zeytinli and Köksal 2012). The method also forms more discriminatory profiles than IS6110 RFLP and spoligotyping (Esen 2003; Peterson 2009). In addition to being sensitive, specific, cheaper, and faster for the complex isolates of *M. tuberculosis*, the sufficiency of its resolution in many cases has led the MIRU-VNTR to become the standard first step in the epidemiology of *M. bovis* (Esen 2003; Oral Zeytinli and Köksal 2012; Yang et al. 2015).

In the present study, 70 *M. bovis* isolates from cattle in Konya province were analyzed using the 12 loci MIRU-VNTR method using the primers given in Table 1. According to our results, MIRU31, MIRU26,

and MIRU10 loci ($h = 0.65, 0.6$, and 0.58 respectively) had high discriminatory power, while the MIRU16 and MIRU40 loci ($h = 0.48$ and 0.29 respectively) had a lower discriminatory power. On the other hand, MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27, and MIRU39 were found to have no discriminatory power. The finding that MIRU31 had the highest discriminatory power was in line with those of Jeon et al. (2008), Besirovic et al. (2012), and Bolado-Martínez et al. (2015), while Supply et al. (2006) found the discriminatory power of this locus to be medium and El Sayed (2019) reported this locus to have the lowest discriminatory power. MIRU26 was reported to have the second highest discriminatory power, which was in line with the findings of several researchers (Hilty et al. 2005; Allix et al. 2006; Supply et al. 2006; Boniotti et al. 2009; Parreiras et al. 2012; Laniado-Laborín et al. 2014; Bolado-Martínez et al. 2015; Vargas et al. 2016), who reported the same result. Another locus with discriminatory power was MIRU10, in line with the findings of Besirovic et al. (2012), and Elsayed (2019) while Bolado-Martínez et al. (2015) and Vargas et al. (2016) reported that this locus had only medium discriminatory power. On the other hand, the lack of discriminatory power of the MIRU 02, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 24, and MIRU 39 loci in our study was in concurrence with studies carried out in Ireland and Brazil (Roring et al. 2004; Figueiredo et al. 2011; Parreiras et al. 2012).

Many studies (Hilty et al. 2005; Allix et al. 2006; Supply et al. 2006; Boniotti et al. 2009; Parreiras et al. 2012; Laniado-Laborín et al. 2014; Bolado-Martínez et al. 2015; Vargas et al. 2016) have been carried out in Europe and in other parts of the world aiming to establish a reference method for the high-resolution genotyping study of mycobacterial strains that can serve as a tool for epidemiological and phylogenetic research. As a result of these researches differences in the discriminatory powers of VNTR loci have been identified in different countries and regions. In the study by Laniado-Laborín et al. (2014), the locus with the highest discriminatory power among the *M. bovis* strains was MIRU26, while the MIRU4 and MIRU31 loci were reported to make no contribution to the discrimination of strains. Bolado-Martínez et al. (2015) and Vargas et al. (2016) from the same country reported MIRU26 and MIRU31 to have the highest discriminatory power, while MIRU4 had only medium discriminatory power. Also, Parreiras et al. (2012) found MIRU26 and MIRU16 to have high discriminatory power in Brazil, while Carvalho et al. (2016) reported MIRU16 to have medium discriminatory power and MIRU26 to have a very low dis-

criminatorial power. The different findings reported in the same or different geographical locations can be attributed to the genetic variations between the causative agents of the disease.

Researchers (Carvalho et al. 2016) have concluded that the movement of animals between different farms or regions can lead to the transmission of *M. bovis* strains between herds. An analysis of the results of the present study revealed variations in the loci with high discriminatory power. Due to the difference between the discriminatory powers of genetic markers between regions and countries, forming an ideal MIRU-VNTR panel will only be possible with access to the data obtained from studies be carried out in different regions or countries of the world (Roring et al. 2004; Hilty et al. 2005). The development of a standard set of loci and a database at an international level will enable *M. bovis* strains to be monitored and compared globally with the genotyping data that will be obtained in the near future, and the sharing of this data. For the accurate genotyping of *M. bovis* strains circulating in the field, it is necessary to establish an international standard model that includes MIRU loci with high discriminatory power, requiring more studies to contribute to the epidemiological resolution. The obtained data will contribute to the easy assessment of interrelated disease foci, with an epidemiological focus view in disease control studies, and will help clarify the transmission dynamics of the disease agents as well as cluster growth, while also being valuable for monitoring infections and determining risk factors.

Through this study, which is a first for Turkey in this field, preliminary data was used to develop a minimal panel that can be used in later genotyping studies of *M. bovis*. We consider that the use of MIRU31, MIRU26, and MIRU10, as loci with high discriminatory powers in the 12 loci MIRU-VNTR panel, as markers for the genotyping of *M. bovis* isolates can contribute to the results.

The use of common pastures by different herds in our region, contact with wildlife, and the high intensity of animal movements due to local trade were found to cause *M. bovis* strains to vary between herds. The fact that the cattle that were the source of isolates in our study came from different herds led to variations in the discriminatory power of MIRU loci.

Ethics statement: This research was approved by the Ethics Committee of the Experimental Medicine Research and Application Center of Selçuk University in Konya, Turkey (Protocol Number: 2009/057).

Financial support and interest relationship: This study was supported by Selçuk University Scientific Research Projects Coordination Unit with project number BAP-09202051. The authors declare that they have no conflict of interest.

A part of this study was presented as an oral presentation in the International Mycobacteria Symposium, Mersin, Turkey (28-30 November 2019).

References

- Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M (2006) Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (6):1951–1962. doi: 10.1128/JCM.01775-0.
- Bolado-Martínez E, Benavides-Dávila I, Candia-Plata MC, Navarro-Navarro M, Avilés-Acosta M, Álvarez-Hernández G. (2015) Proposal of a screening MIRU-VNTR Panel for the preliminary genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *BioMed Research International*. 1–7. doi: 10.1155/2015/416479
- Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. (2009) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(3), 636–644. doi: 10.1128/JCM.01192-08
- Besirovic H, Amer A, Spicic S, Cvetnic Z, Prasovic S, Velic L. (2012) Bovine tuberculosis in Bosnia and Herzegovina caused by *Mycobacterium caprae*. *Vet. Arhiv*. 82(4), 341–349.
- Carvalho RCT, Vasconcellos SEG, Issa MA, Filho PMS, Mota PMPC, de Araújo FR, Carvalho ACS, Gomes HM, Suffys PN, Figueiredo EES, Paschoalin VMF. (2016) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* from cattle reared in Midwest Brazil. *Plos One*. 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0162459
- Duarte EL, Domingos E, Amado A, Cunha MV, Botelho A. (2010) MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*. 143, 299–306. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.027
- Egbe NF, Muwonge A, Ndiip L, Kelly RF, Sander M, Tanya V, Ngu Ngwa V, Handel IG, Novak A, Ngandalo R, Mazeri S, Morgan KL, Asuquo A, Bronsvort BMC. (2017) Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Cameroon. *Scientific Reports*. 7 (4652) doi: 10.1038/s41598-017-04230-6
- El Sayed MS. (2019) A first insight into the application of high discriminatory MIRU-VNTR typing using QIAxcel technology for genotyping *Mycobacterium bovis* isolated from the Delta area in Egypt. *Infection. Genetics and Evolution*. 71, 211–214. doi: 10.1016/j.meegid.2019.04.004
- Esen N. (2003) Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde moleküler yöntemlerin değeri. In: 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, Türkiye; 402–408.
- Figueiredo EES, Ramos DF, Medeiros L, Silvestre FG, Lilenbaum W, Silva JT, Paschoalin VMF, Dellagostin OA. (2012) Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. *The Veterinary Journal*. 193, 296–298 doi: 10.1016/j.tvjl.2011.11.006

- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. (1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 144(1), 1189-1196. doi :10.1099/00221287-144-5-1189
- Hilty M, Diguimbaye C, Schelling E, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J. (2005) Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Veterinary Microbiology*. 109, 217-222. doi:10.1016/j.vetmic.2005.05.017
- Jeon BY, Je S, Park J, Kim Y, Lee EG, Lee H, Seo S, Cho SN. (2008) Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. *Journal Veterinary Science*. 9(2), 145-153. doi: 10.4142/jvs.2008.9.2.145
- Köksalan OK (2010). Günümüzde tüberküloz tanısı/güçlükleri. *Ankem Dergisi*. 24(2), 61-63
- Laniado-Laborin R, Muñoz-Salazar R, García-Ortiz RA, Vargas-Ojeda AC, Villa-Rosas C, Ocegüera-Palao L. (2014) Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. 27, 1-5. doi : 10.1016/j.meegid.2014.06.020
- Matos F, Amado A, Botelho A. (2010) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: a case report. *Veterinarni Medicina*. 55(3), 133-136. doi: 10.17221/137/2009-VETMED
- Oral Zeytinli Ü, Köksal F. (2012) Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Cukurova region, Turkey by spoligotyping and MIRU-VNTR methods. *Mikrobiyol Bul*. 46(2), 202-210.
- Parreiras PM, Andrade GI, Nascimento TF, Oelemann MC, Gomes HM, Alencar AP, Assis RA, Mota PMPC, Pereira MAS, Lobato FCF, Lage AP, Suffys PN. (2012) Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107(1), 64-73. doi: 10.1590/S0074-02762012000100009
- Peterson R. (2009). Molecular Epidemiology of Tuberculosis. Karolinska Institutet. Phd. Stockholm. Sweden.
- Roring S, Scotta AN, Hewinsonb RG, Neillc SD, Skuce RA. (2004) Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Veterinary Microbiology*. 101, 65-73. doi:10.1016/j.vetmic.2004.02.013
- Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SMM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD. (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*. 148, 519-528. doi: 10.1099/00221287-148-2-519
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(12), 4498-4510. doi: 10.1128/JCM.01392-06
- Vargas AN, Suazo FM, Alarcónb GJC, Venegas YR, Solorio RG, Hernández ER, Martínez OP. (2016) Genetic diversity based on MIRU-VNTR profile of isolates of *Mycobacterium bovis* from Mexican cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 2016; 131, 75-78. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.07.007
- Wedlock DN, Skinner MA, Lisle GW, Buddle BM. (2002) Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection*. 4, 471-480. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01562-9
- Yang L, Wang C, Wang H, Meng Q, Wang Q. (2015) Evaluation of MIRU-VNTR for typing of *Mycobacterium bovis* isolated from Sika deer in Northeast China. *Veterinary Research* 11(93), 1-7. doi: 10.1186/s12917-015-0402-0



Gamitromisin ve Tulatromisinin sığır trakea düz kası üzerine etkileri

Yaşar Şahin^{1*}, Ebru Yıldırım², Begüm Yurdakök Dikmen³

^{1,2} Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 01.07.2020, Kabul tarihi / Accepted: 25.11.2020

Özet: Bu çalışmada; sığır solunum yolu hastalıklarında yaygın olarak kullanılan gamitromisin ve tulatromisinin, erkek Simental ırkı sığır trakea düz kası üzerine etkilerinin izole organ banyosunda araştırılması ve bu iki makrolid antibiyotiklerin etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı. İlk protokolde gamitromisin ve tulatromisin 10^{-7} - 3×10^{-5} M derişimlerinde tek başına, trakea düz kası üzerine etkisiz olduğu bulundu. İkinci protokolde; 20 dakika 3×10^{-5} M gamitromisin veya tulatromisin ile inkübe edilen trakea düz kası üzerine kümülatif (ACh) (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimleri uygulandı, elde edilen yarı en yüksek değer için gerek duyulan maddenin derişiminin negatif logaritması (pD_2) ve ilaç tarafından oluşturulan maksimum etkinliğin % (yüzde) şeklinde ifadesi (E_{max}) değerleri arasında fark bulunamadı. Üçüncü protokolde; 65 mM potasyum klorür (KCl) ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine uygulanan gamitromisin ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimlerinde bir fark bulunamadı. Asetilkolin EC_{85} ($2,3 \times 10^{-4}$ M) değeriyle ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin araştırıldığı dördüncü protokolde; tulatromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimlerinde kasılma veya gevşeme yanıtı oluşmadı. Buna karşın gamitromisinin 10^{-7} M ($5,45 \pm 1,13$) ve 10^{-6} M ($8,51 \pm 1,69$) derişimlerinde, kontrole göre istatistiksel olarak gevşeme cevapları tespit edildi ($p < 0,05$). Dördüncü protokol sonucu yapılan son protokolde; gamitromisinin 10^{-6} M derişiminin inkübasyonunda; ACh cevaplarının E_{max} değeri sayısal olarak azalmıştır. Sonuç olarak derişime bağlı şekilde gamitromisin; ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda az da olsa gevşeme etkisi göstermiş olup, bu etki özellikle astım ya da solunum yolunda ödeme seyreden hastalıklarda tedaviye katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Gamitromisin, izole organ banyosu, sığır, trakea düz kas, tulatromisin

Effects of Gamithromycin and Tulathromycin on bovine tracheal smooth muscle

Abstract: In this study; the effects of gamithromycin and tulathromycin, which are widely used in bovine respiratory diseases, on the bovine trachea smooth muscle derived from male Simental strain were evaluated in isolated organ bath and the effects of these two macrolide antibiotics were compared. In the first protocol gamithromycin and tulathromycin had no effect on the tracheal smooth muscle at 10^{-7} - 3×10^{-5} M concentrations. In the second protocol, ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) concentrations were applied cumulatively on the tracheal smooth muscle incubated with 3×10^{-5} M gamithromycin or tulathromycin for 20 minutes, no difference was found between the obtained pD_2 and E_{max} values. In the third protocol; concentrations of gamithromycin and tulathromycin concentrations (10^{-10} - 10^{-5} M) had no effect on the tracheal smooth muscle precontracted with 65 mM KCl. In the fourth protocol the effects of gamithromycin and tulathromycin on the tracheal smooth muscle pre-contracted with EC_{85} value of ACh ($2,3 \times 10^{-4}$ M) were investigated. No contraction or relaxation response occurred in the concentrations of tulathromycin (10^{-10} - 10^{-5} M). In contrast, 10^{-7} M ($5.45 \pm 1.13\%$) and 10^{-6} M ($8.51 \pm 1.69\%$) concentrations of gamithromycin showed statistically significant relaxation ($p < 0.05$). The last protocol was made according to the results of fourth protocol; and incubation of 10^{-6} M gamithromycin decreased the E_{max} value of ACh concentrations numerically. As a result, depending on the concentration, gamithromycin showed a slight relaxation effect on tissues precontracted with ACh, and this effect may contribute to the treatment of diseases especially in asthma or respiratory edema.

Keywords: Bovine, gamithromycin, isolated organ bath, trachea smooth muscle, tulathromycin

Giriş

Makrolid grubu antibiyotikler; solunum yolu, ürogenital, cilt, yumuşak doku enfeksiyonları ve penisiline alerjisi olan hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (Carbon 1998, Kannan ve Mankin 2011, Zuckerman ve ark. 2011). Bu antibiyotikler; güçlü antibakteriyel etki gösterebilirler de, genellikle zayıf biyoyararlanım ve öngörülemez bazı farmakokinetik özelliklerinden dolayı yeni nesil türev-

lerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (Dinos 2017). Bu nedenle sığır solunum yolu hastalıkları tedavisi için, yeni nesil yarı-sentetik tulatromisin ve gamitromisin geliştirilmiştir (Sgoifo ve ark. 2010, Lechtenberg ve ark. 2011, Maletić ve ark. 2015). Gamitromisin ve tulatromisin (%10'u 13 üye halkalı ve %90'ı 15 üye halkalı regioizomer karışımı) 15 üyeden oluşan lakton halkalılar grubunda yer almakta olup, yapılarında azot atomu bulunduğundan aza-

lidler olarak da adlandırılmaktadır (Giguère 2013). Her iki antibiyotik; hızlı emilim (Wang ve ark. 2011, Kellermann ve ark. 2014), geniş dağılım ve yüksek biyoyararlanım gibi farmakokinetik parametrelere sahiptirler (Evans 2005, Huang ve ark. 2009). Sahip oldukları bu farmakokinetik özelliklere bağlı olarak, siğir solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve korunmasında iyi antibakteriyal ilaçlar oldukları bilinmektedir (Evans 2005, Huang ve ark. 2009). Ancak makrolid antibiyotikler antimikrobiyal etkilerinin yanında, anti-inflamatuvar etki gibi ikincil özellikleri de bulunmaktadır (Steel ve ark. 2012). Ayrıca bu sınıfta yer alan azitromisin gibi antibiyotiklerin; antibakteriyel ve anti-inflamatuvar etkilerinin yanında bronkodilatör etkilerinin bulunduğu da bildirilmiştir (Daenas ve ark. 2006). Memelilerin solunum yolu düz kası; hem kasılma hem de gevşetici innervasyon özelliğine sahip olup, *in vivo* veya *in vitro* olarak belirgin şekilde daralma veya genişleme özelliklerine sahiptir (Canning ve Fischer 2001). Solunum yolu düz kas tonusu; hormon, nörotransmitter, ilaç ve mediatör gibi birçok maddeden etkilenmektedir (Barnes 1989). Bu nedenle yapılan çalışmada; siğir solunum yolu hastalıklarında yaygın olarak kullanılan gamitromisin ve tulatromisinin siğir trakea düz kası üzerine farmakodinamik etkilerinin araştırılması ve bu iki makrolid antibiyotiğin etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada hayvan materyali olarak mezbahada kesilen 12-36 aylık, 32 erkek Simental ırkı siğirlardan elde edilen 84 trakeanın üst 1/3'lük kısımları kullanılmıştır. Kesimden hemen sonra trakea örnekleri, önceden hazırlanmış olan modifiye Krebs çözeltisi içeren behere konulup, soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Modifiye Krebs çözeltisi (mM): NaCl (Merck, Almanya): 136,8, KCl (Merck, Almanya): 5,4, CaCl₂ (Merck, Almanya): 1,5, MgCl₂ (Merck, Almanya): 1,0, NaHCO₃ (Merck, Almanya): 11,9, glukoz (Merck, Almanya): 5,5 (pH 7,2). Trakea düz kası, steril penset ve makas yardımıyla kıkırdak, bağ ve epitel dokularından temizlenerek, yaklaşık 2 mm genişliği ve 7 mm uzunluğunda olacak şekilde izole edildi. İzole edilen trakea düz kas kesiti 10 mL modifiye Krebs çözeltisi (37°C) içeren izole organ banyosuna 3 g'lık ön gerim uygulanarak asıldı. Deney sırasında dokulara; %95 O₂ ve %5 CO₂ gaz karışımı uygulandı (Kaneda ve ark. 2005). Çalışmada kullanılan gamitromisin (Sigma-Aldrich 32161, Almanya) ve tulatromisin (Sigma-Aldrich SLM2107, Almanya), dimetil sülfoksit (DMSO, İsolab, Almanya) de çözdürüldü.

Deney Protokolleri

İzole edilen trakea düz kası; 3 g'lık ön gerim uygulanmasından sonra, kırk beş dakikalık dengelenme süresi boyunca 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandı. Dengelenme süresi sonrasında asetilkolin (ACh, Sigma A 6625, Almanya) ile canlılık bakıldı ve tekrar 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandı. Ardından aşağıdaki beş protokol uygulandı.

Siğir trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin tek başına araştırılması amacıyla yapılan birinci protokolde; dokulara kümülatif olarak gamitromisin ve tulatromisin (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M) derişimleri uygulandı. Aynı dokular, kırk beş dakikalık dengelenme süresi boyunca 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile tekrar yıkandıktan sonra DMSO (seyreltmeleri) kontrol amacıyla uygulandı.

Trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin ACh ile birlikte araştırılması amacı için yapılan ikinci protokolde; önce dokulara kümülatif olarak ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) denenip, dokular yıkandı. Dokular, 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandıktan sonra, 20 dakika 3×10^{-5} M gamitromisin veya tulatromisin ile inkübe edildi ve kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimleri uygulandı. Aynı dokular yıkanıp, 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile tekrar yıkanıp, dengelendikten sonra, 20 dakika DMSO (seyreltmeleri) ile inkübe edilip kümülatif ACh derişimleri uygulandı.

Potasyum klorür (KCl) ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin araştırılması için yapılan üçüncü protokolde; dokular 65 mM KCl (Kaneda ve ark. 2018) ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturuldu. Üzerine kümülatif olarak gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M), DMSO (seyreltmeleri) ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimleri uygulandı. Her farklı madde için ayrı bir trakea düz kası kullanıldı.

Asetilkolin EC₈₅ değeri ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin araştırılması amacı için yapılan dördüncü protokolde; dokulara $2,3 \times 10^{-4}$ M ACh (GraphPad Prism Software ver. 6 programı ile daha önceden elde edilen ACh derişim yanıt eğrilerinden, ACh'ın EC₈₅ değeri elde edildi, n:12) derişimi uygulanarak ön kasılma oluşturuldu. Asetilkolin uygulaması sonrası platoya gelen dokular üzerine kümülatif olarak gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimleri uygulandı. Aynı dokular yıkanıp, 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi

ile tekrar yıkanıp dengelendikten sonra, DMSO (seyreltmeleri) uygulandı.

Dördüncü protokol sonucu; gamitromisinin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde, trakea düz kası az da olsa gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı bulununca beşinci protokol yapılması kararlaştırıldı. Trakea düz kası üzerine 10^{-6} M gamitromisin etkisinin ACh ile birlikte araştırılması amacıyla yapılan son protokole; dokulara kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimleri denenip, dokular yıkandı. Dokular; 3 kez 15 dakika ara tekrar yıkanıp dengelendikten sonra, 20 dakika 10^{-6} M gamitromisin ile inkübe edildi ve kümülatif olarak ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimleri uygulandı. Daha sonra aynı dokular, 15 dakika ara ile 3 kez yıkandı ve dengelenme sonrası üzerinde 20 dakika DMSO seyreltmeleri ile inkübe edilip ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimleri uygulandı.

İstatistiksel Değerlendirme

Dokularda oluşan; kasılma ve gevşemeler veya gerimde meydana gelen değişiklikler izometrik gerim ileticisi (Biopac Systems Mp 35, Commat, Türkiye) ile ölçüldü ve her bir protokol kendi içinde ayrı ayrı değerlendirildi. Birinci protokole göre elde edilen verileri, bazal çizgi 100 kabul edilerek % (yüzde) kasılmalarına göre hesaplandı ve değerlendirildi. İkinci ve beşinci protokolde tüm derişimlerin bazal çizgiye göre % (yüzde) kasılmaları hesaplandı ve elde edilen bu verilerden ACh kasılmalarının pD_2 ve E_{max} değerleri GraphPad Prism (Software ver. 6) Programı ile belirlendi. Daha sonra pD_2 ve E_{max} değerlerinin karşılaştırılması yapıldı. Bulunan pD_2 değeri yarı en yüksek değer için gerek duyulan maddenin derişiminin negatif logaritması; E_{max} ise, ilaç tarafından oluşturulan maksimum etkinliğin % (yüzde) şeklinde ifadesi olarak tanımlandı. Üçüncü deneyde ise KCl ile ön kasılma oluşturulan dokuların ulaştığı maksimum kasılma % 100 olarak kabul edildi. Ardından oluşan gevşeme yanıtları bu değer 100 kabul edilerek hesaplandı. Dördüncü protokolde; ilk olarak ACh'nin EC_{85} derişimi belirlendi. Bu derişim ile dokularda ön kasılma oluşturuldu. Dokularda kasılma sonucu elde edilen maksimum kasılma % 100 olarak kabul edildi. Madde uygulaması sonrası dokularda meydana gelen gevşeme yanıtları bu değer 100 kabul edilerek hesaplandı.

Sunulan çalışmada elde edilen veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verildi. İstatistik analizler SPSS 15.0 paket programında yapıldı. Yapılan testlerde $P < 0,05$ değeri önemli olarak kabul edildi. Grupların parametrik dağılıp dağılmadığına normalite testi ile bakıldı. İzole organ banyosu için yapılan analizlerde ikinci protokolde; gamitro-

misin uygulanan dokularda pD_2 parametrik, tulatromisinde ise nonparametrik olarak dağılmış, E_{max} ise gamitromisin uygulanan grupta nonparametrik, pD_2 ise parametrik olarak dağılmıştır. Parametrik dağılan gruplarda tekrarlı ANOVA, nonparametrik dağılanlara ise Friedman testi uygulanmıştır. Üçüncü grupta OneWay ANOVA, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi (post hoc) uygulanmıştır. Nonparametrik testler ise Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Dördüncü grupta; eşli karşılaştırmalar yapıldı. Tulatromisin derişimlerinden 10^{-6} M normal dağılım olmadığından Wilcoxon non- parametrik testi yapıldı. Normal dağılım gösteren tulatromisin derişimleri (10^{-6} M hariç) ve gamitromisin derişimlerine eşli gruplar T testi uygulandı. Normal dağılım gösteren derişimlerde (10^{-6} M hariç) T testi, normal dağılım göstermeyen 10^{-6} M derişime ise Mann Whitney U testi uygulandı. Yapılan testlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Son protokolde ise; E_{max} ve pD_2 değerleri normal dağılım göstermediği için Friedman testi yapıldı ve E_{max} değerinde fark bulundu ve hangi gruplar arasında fark olduğunu tespit etmek için Wilcoxon testi yapıldı. Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra $p < 0,016$ olarak kabul edildi.

Bulgular

Gamitromisin ve tulatromisin (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M) derişimlerinin, siğır trakea düz kası üzerine kasılma veya gevşeme yanıtları göstermedi. Gamitromisin (3×10^{-5} M), tulatromisin (3×10^{-5} M) ve DMSO'nun derişimlerinin 20 dakikalık inkübasyonu sonrası, kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrileri elde edildi. Elde edilen pD_2 ve E_{max} değerleri hesaplandı ve bulgular Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterildi. Asetilkolin derişimleri pD_2 ve E_{max} değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunamadı ($P > 0,05$).

Tablo 1. Asetilkolin, Gamitromisin+ACh, DMSO+ACh pD_2 ve E_{max} değerleri

Uygulama	pD_2	E_{max}
ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	4,81 $\pm$ 0,13	1473,06 $\pm$ 607,41
3×10^{-5} M Gamitromisin+ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	4,72 $\pm$ 0,21	1845,82 $\pm$ 616,63
DMSO+ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	4,81 $\pm$ 0,15	1672,40 $\pm$ 636,99

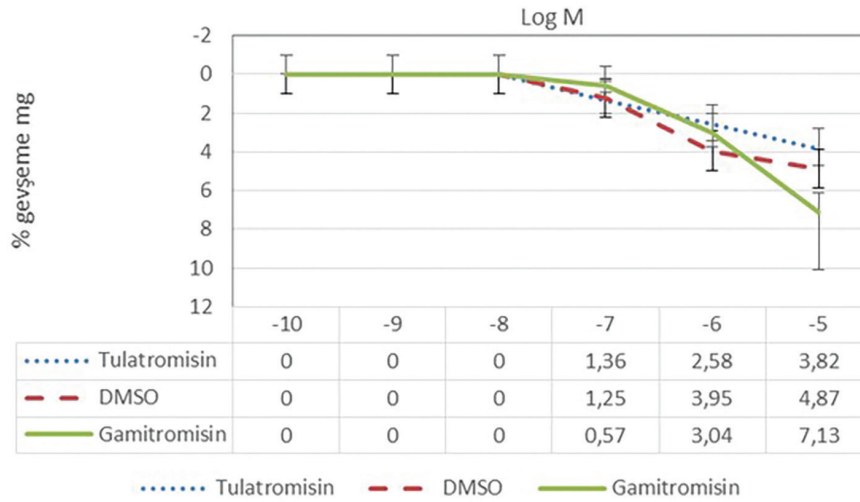
Aynı sütundaki gruplar arasında fark yoktur ($P > 0,05$)

Potasyum klorür (65 mM) ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin sonuçları Şekil 1'de gösterildi. Yapılan analiz sonucunda, grup derişimleri karşılaştırılmış ve gruplar arasında fark bulunamadı ($P > 0,05$).

Tablo 2. Asetilkolin, Tulatromisin+ACh, DMSO+ACh pD_2 ve E_{max} değerleri

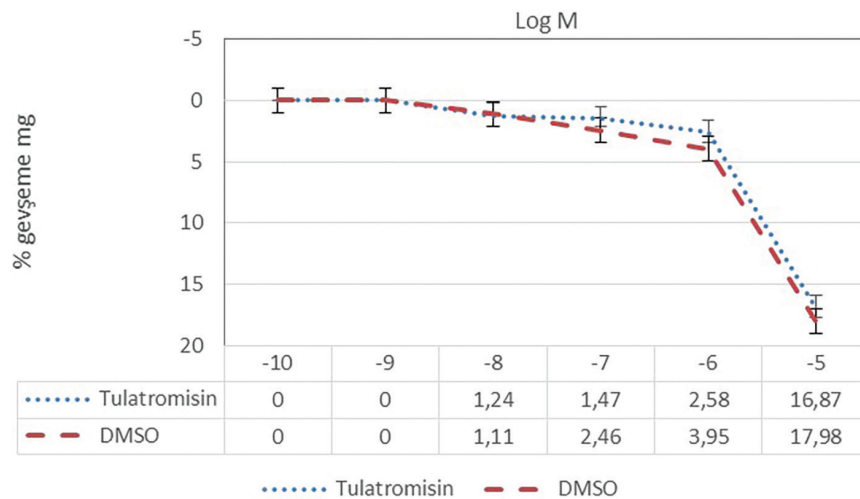
Uygulama	pD_2	E_{max}
ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	$5,11 \pm 0,09$	$1187,94 \pm 318,17$
3×10^{-5} M Tulatromisin+ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	$5,37 \pm 0,11$	$665,24 \pm 145,97$
DMSO+ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	$5,31 \pm 0,11$	$695,34 \pm 101,89$

Aynı sütundaki gruplar arasında fark yoktur ($P>0,05$)

**Şekil 1.** Potasyum klorür ile ön kasılma oluşturulan dokularda tulatromisin, DMSO ve gamitromisin uygulaması sonucu oluşan % gevşeme cevapları (n:8)

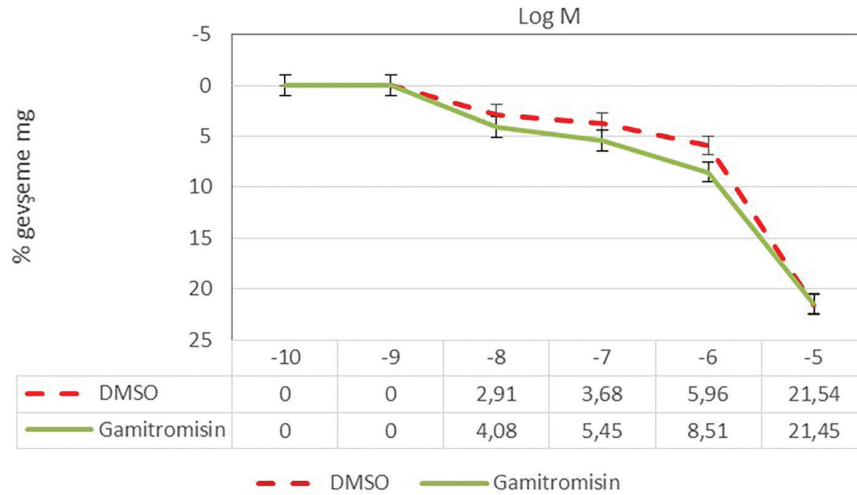
Asetilkolin EC_{85} değeri ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisin derişimlerinin etkileri sonuçları Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterildi. Yapılan analiz sonucunda, tulatromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimleri arasında istatistik olarak

bir fark bulunamadı ($P>0,05$). Buna karşın gevşeme yanıtları çok yüksek olmasa da 10^{-7} M ($\%5,45 \pm 1,13$) ve 10^{-6} M'da ($\%8,51 \pm 1,69$) gamitromisinin gevşeme cevapları kontrole göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edildi ($P<0,05$).

**Şekil 2.** $2,3 \times 10^{-4}$ ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, tulatromisin ve DMSO seyreltmeleri yanıt eğrisi

Dördüncü protokolün sonucunda gamitromisin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde görülen gevşeme yanıtları istatistiki olarak anlamlı bulunması sonucu, trakea düz kası üzerine 10^{-6} M gamitromisin etkisinin ACh ile birlikte araştırıldı. Bu protokolde elde edilen pD_2 ve E_{max} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Tablo 3'te gösterildi. Yapılan çalışmada, pD_2 değerleri ara-

sında bir fark tespit edilmedi ($P>0,05$). Buna karşın E_{max} değerleri arasında ise farklılık çıkmıştır ($P<0,05$). Bu farkın; gamitromisin inkübasyonu ile DMSO inkübasyonu arasında ($P=0,028$) olduğu görülmüş, ancak istatistiki olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra bu farklılığın istatistiksel değil sayısal olduğu saptandı ($P>0,016$).



Şekil 3. $2,3 \times 10^{-4}$ ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, gamitromisin ve DMSO seyreletmeleri yanıt eğrisi

Tablo 3. Asetilkolin, 10^{-6} M Gamitromisin+ACh, DMSO+ACh pD_2 ve E_{max} değerleri

Uygulama	pD_2	E_{max}
ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	$5,04 \pm 0,18$	$1408,67 \pm 820,57$
10^{-6} M Gamitromisin+ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	$5,05 \pm 0,14$	$828,82 \pm 702,67$
DMSO+ACh (10^{-8} - 10^{-3} M)	$5,01 \pm 0,32$	$2275,58 \pm 2165,70$

* Aynı sütundaki E_{max} değerleri arasındaki fark vardır ($P < 0,05$). Fakat E_{max} grupları arasındaki fark Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,016$).

Tartışma ve Sonuç

Veteriner sahada antibiyotik sağaltımının etkili bir şekilde yapılabilmesi için antibiyotik moleküllerinin temel kimyasal yapılarının, etki şekillerinin iyi anlaşılması, antimikrobiyel etkinliğinin iyi değerlendirilmesi, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin doğru bir şekilde saptanması önem arz etmektedir (Bambeke ve Tulkens 2001).

Solunum yolu düz kası, solunum yolu hacmini kontrol eden unsurların en başında yer almaktadır. Solunum yolu düz kası üzerinde yapılacak olan çalışmalar; astım gibi solunum yolu hastalıklar sonucu ortaya çıkan fizyopatolojik durumların çözümüne fırsat sağlayabileceği düşünülmektedir (An ve ark. 2007). Solunum yolu hastalıkları tedavisinde en çok tercih edilen makrolidlerin; sadece anti-bakteriyel etkinliğinin değil aynı zamanda solunum yolu düz kasları üzerine etkileri de değerlendirilmelidir (Anadón ve Reeve-Johnson 1999, Panettieri ve ark. 2008, Kannan ve Mankin 2011, Pyörälä ve ark. 2014).

Köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada; makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin ve oleandomisin gibi 14 üyeli makrolidlerin köpeklerin mide bağırsağında kasılma doğurucu ve endojen motilin

salgılayıcı bir etkisi olduğunu ancak 16 üyeli lekominisin, asetilspiramisin ve tilosinin böyle bir etkiye sahip olmadığı saptanmış; etkide oluşan bu farklılığın makrolidlerin kimyasal yapılarındaki farklılığa bağlanmışlardır (Itoh ve ark. 1985). Trak ve ark. (2019) gamitromisinin sıçan uterus düz kası kasılmaları üzerine etkisini araştırmış ve gamitromisinin sıçan uterus kasılmaları üzerine tek başına bir etkisi olmadığını saptamıştır. Çalışılan dokular farklı olmakla birlikte bu çalışma; Itoh ve ark. (1985) ve Trak ve ark. (2019) çalışmasıyla uyumlu olup, gamitromisin ve tulatromisinin tek başına siğır trakea düz kası üzerine etki oluşturmamıştır. Bu durumun; ilaçların kimyasal yapıları veya deneylerde kullanılan tür ve doku farklılığından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Potasyum klorür; Ca^{+2} dalgali salınımını indükleyip, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) miktarının artışıyla birlikte solunum yolu düz kası hücrelerinin kasılmasına neden olmaktadır (Sanderson ve ark. 2008, Wang ve ark. 2010). Siğır trakea düz kasına 65 mM KCl uygulandığında kasın, kasılma şiddetinin yavaş yavaş arttığı (maksimum kasılmaya ulaşma süresi yaklaşık 15 dakika) ve maksimum kasılma seviyesinde belli süre (yaklaşık 120 dakika) devam ettiği bildirilmiştir (Kaneda ve ark. 2006). Sunulan çalışmada Kaneda ve ark. (2006) farklı olarak 65 mM KCl uygulanmasından yaklaşık 30 dakika sonra platoya eriştiği bulunmuştur. Daenas ve ark. (2006) bir makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin, KCl (80 mM) ve karbakol (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen tavşan trakeası üzerine etkisini incelemişlerdir. Karbakol (10^{-5} M) ile ön kasılma oluşturulan tavşan trakeası 10^{-6} ve 10^{-4} M azitromisin gevşeme yanıtı oluşturduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, azitromisinin 10^{-4} M derişimi, KCl (80 mM) ile prekontrakte edilen tavşan trakeasını gevşettiğini bulmuşlardır. Tulatromisinin 1, 2,

4, 8 ve 16 mM derişimlerinin sıçan uterus kasılmaları üzerine etkisini araştıran Mehrdad ve ark. (2011); KCl (80 mM) ile prekontrakte edilen sıçan uterus düz kasının derişime bağılı olarak gevşediğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, 65 mM KCl ile ön kasılma oluşturulmuş simental ırkı sığır trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimlerinin bir etkisi bulunmamıştır. Sunulan çalışmanın bahsi geçen çalışmalardan farklı olmasının nedeni etken maddelerinin; kimyasal yapılarının ve derişimlerinin, uygulandığı hayvan türlerinin ve dokularının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Asetilkolin; parasempatik sinir sisteminin önemli bir nöromediyotörüdür ve çeşitli düz kasları (ileum, sidik kesesi, solunum yolu ve damar gibi düz kasları) depolarize etmektedir. Asetilkolin, muskarinik reseptörleri aktive ederek kasılma olayını başlatmaktadır (Zholos ve ark. 2004). Asetilkolin derişimine bağılı olarak; sığır, domuz, kobay, sıçan ve fare trakea düz kasının kasılmasına neden olmaktadır (Kaneda ve ark. 2018). Trakea düz kası ACh ile uyarıldığında, trakea düz kas hücrelerinde eş zamanlı olmayan (tekrarlayan) Ca^{+2} dalgaları oluşmakta olup, (Dai ve ark. 2005) sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici bir artışıyla kasılma meydana gelmektedir (Jones ve ark. 1993). Tamaoki ve ark. (1995) makrolid grubu antibiyotikleri olan eritromisin, roksitromisin ve klaritromisinin bronşlar üzerine etkisini araştırmışlardır. Eritromisin, roksitromisin ve klaritromisinin (3×10^{-5} M) inkübasyonu sonrası ACh derişimlerinin oluşturduğu kasılmaları değiştirmedeğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışma bahsi geçen çalışma ile uyumlu olup, gamitromisin ve tulatromisinin (3×10^{-5} M) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimlerinin oluşturduğu kasılmaların pD_2 ve E_{max} değerlerini değiştirmedeğini bulunmuştur. Çalışılan doku ve etken maddeler farklı olmakla birlikte, bu çalışmanın sonucu ile uyumludur (Tamaoki ve ark. 1995).

Wang ve ark. (2019) azitromisinin; insan, fare, kobay ve tavşanın solunum yolu düz kası üzerine etkisini incelemişlerdir. Azitromisin, ACh (10^{-4} M) derişimi uygulanması ile ön kasılma oluşturulmuş solunum yolu düz kası gevşeme yanıtı oluşturduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada solunum yolu düz kası üzerinde makrolid grubu antibiyotik olan roksitromisin ve klaritromisinin gevşeme yanıtının azitromisine göre daha az olduğu diğer antibiyotiklerin (aminoglikozitler, penisilin ve streptomisin) ise gevşeme yanıtı oluşturmadığını eklemişlerdir. Ayrıca azitromisin; L tipi voltaja bağılı kalsiyum kanalı ve M_2 reseptörünü inhibe edip sitolitik Ca^{+2} derişimini azaltarak solunum yolu düz kasında gevşeme oluş-

turduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada $2,3 \times 10^{-4}$ M (EC_{85}) ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimlerinin etkisine bakılmıştır. Gamitromisin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasında gevşeme yanıtı görülürken, tulatromisin derişimlerinde gevşeme yanıtı görülmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları bahsi geçen çalışma ile uyumlu olup, $2,3 \times 10^{-4}$ M (EC_{85}) ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin (10^{-7} ve 10^{-6} M) her ne kadar azitromisin (10^{-5} M) kadar gevşeme yanıtı oluşturmada da dilatasyon yapıcı etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Asetilkolin EC_{85} derişimi ile ön kasılma oluşturulan dokularda gamitromisinin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde az da olsa gevşeme yanıtları kontrolün gevşeme yanıtlarına göre istatistiksel bir farklılık bulunmuştur. Bu sebeple deneylere 10^{-6} M gamitromisin inkübasyonu da eklenmiştir. Sonuçta, istatistiksel olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldığında ($P>0,016$) önemli olarak bulunmasa da, gamitromisin inkübasyonu sayısal olarak kontrol grubuna göre ACh'nin E_{max} değerini düşürmüştür. Yani gamitromisin derişime bağılı şekilde ACh'nin maksimum etki derecesini azaltmıştır. Gamitromisin kullanılırken böyle bir etki ile karşılaşılabilir göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak makrolid antibiyotiklerin etkileri; kimyasal yapıları, kullanılan derişimleri ve uygulandıkları dokular ve hayvan türlerine bağılı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Gamitromisin ve tulatromisin tek başlarına sığır trakea düz kas tonusunda değişikliğe yol açmazken, gamitromisin ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda az da olsa derişime bağılı olarak gevşeme etkisi göstermiştir. Bu etki, pratik olarak klinik uygulamalarında özellikle astım ya da solunum yolunda ödeme seyreden hastalıklarda tedaviye katkı sağlayabilir.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: "Sığırlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea düz kasının kasılması ile trakea epitel hücreleri üzerine apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması" başlıklı tezin bir kısmından özetlenen bu çalışma; Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, 2018/047 proje numarası ile desteklenmiştir. Yazarların herhangi bir çıkarıya dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

An SS, Bai TR, Bates JHT, Black JL, Brown RH, Brusasco V, Chitano P, et. al. (2007) Airway smooth muscle Dynamics: a common

- pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J.* 29(5), 834-860.
- Anadón A, Reeve-Johnson L (1999) Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Res Vet Sci.* 66(3), 197-203.
- Bambeke FV, Tulkens PM. (2001) Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents.* 18, 17-23.
- Barnes PJ. (1989) Airway receptors. *Postgrad Med J.* 65(766), 532-542.
- Canning BJ, Fischer A. (2001) Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Res Physiol.* 125(1-2), 113-127.
- Carbon C. (1998) Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: effect on extracellular pathogens. *Clin Infect Dis.* 27(1), 28-32.
- Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulisanis KI, Molyvda PA. (2006) Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 553(1-3), 280-287.
- Dai JM, Kuo K-H, Leo JM, Breemen CV, Lee C-H. (2005) Mechanism of ACh-induced asynchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(3), 459-469.
- Dinos GP. (2017) The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol.* 174(18), 2967-2983.
- Evans NA. (2005) Tulathromycin: an overview of a new triamylide antimicrobial for livestock respiratory disease. *Veterinary Therapeutics.* 6(2), 83-95.
- Giguère S. (2013) Macrolides, azalides, and ketolides. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Fifth edition, Wiley Blackwell, Iowa, p:211-231.
- Huang RA, Letendre LT, Banav N, Fischer J, Somerville B. (2009) Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma and lung tissue concentrations and plasma antibacterial activity. *J Vet Pharmacol Therap.* 33(3), 227-237.
- Itoh Z, Suzuki T, Nakaya M, Inoue M, Arai H, Wakabayashi K. (1985) Structure-activity relation among macrolide antibiotics in initiation of interdigestive migrating contractions in the canine gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 248(3), 320-325.
- Jones KA, Housmans PR, Warner DO, Lorenz RR, Rehder K. (1993) Halothane alters cytosolic calcium transient in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 265(1), 80-86.
- Kaneda T, Kanda H, Tajima T, Urakawa N, Shimizu K. (2018) Imidazole-induced contractions in bovine tracheal smooth muscle are not dependent on the cAMP pathway. *J Vet Med Sci.* 80(2), 341-345.
- Kaneda T, Sakaguchi R, Shimizu K, Urakawa N, Nakajyo S. (2006) Effects of high-K⁺, Na⁺-deficient solution on contractility of the smooth muscles of the bovine trachea. *J Vet Med Sci.* 68(10), 1039-1045.
- Kaneda T, Takeuchi Y, Matsui H, Shimizu K, Urakawa N, Nakjyo S. (2005) Inhibitory mechanism of papaverine on carbachol-induced contraction in bovine trachea. *J Pharmacol Sci.* 98(3), 275-282.
- Kannan K, Mankin AS. (2011) Makrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann N Y Acad Sci.* 1241, 33-47.
- Kellermann M, Huang RA, Forbes AB, Rehbein S. (2014) Gamithromycin plasma and skin pharmacokinetics in sheep. *Res Vet Sci.* 97(2), 199-203.
- Lechtenberg KF, Daniels CS, Schieber T, Bechtol DT, Drag M, Kunkle BN, Chester ST, Tessman RK. (2011) Field efficacy study of gamithromycin for the treatment of bovine respiratory disease associated with *Mycoplasma bovis* in beef and non-lactating dairy cattle. *Intern J Appl Res Vet Med.* 9(3), 225-232.
- Maletić J, Djelić N, Radaković M, Maletić M, Lakić N, Kukolj V, Aleksić N, Andjelković M, Stanimirović Z. (2015) Evaluation of DNA damage in rat lymphocytes exposed to tulathromycin in vitro. *Genetica.* 47(1), 339-348.
- Mehrdad NG, Yagoob A, Saeid S, Sina S. (2011) Effects of tulathromycin (Draxxin) on contractility of isolated myometrium in rats. *Middle-East J Sci Res.* 10(4), 496-500.
- Panettieri RA, Kotlikoff MI, Gerthoffer WT, Hershenson MB, Woodruff PG, Hall IP, Banks-Schlegel S. (2008) Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling: basic knowledge to clinical relevance. *Am J Respir Crit Care Med.* 177(3), 248-252.
- Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, Dujkeren EV, Greko C, Moreno MA, Pomba MCMF, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. (2014) Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal.* 200, 230-239.
- Sanderson MJ, Demoltte P, Bai Y, Perez-Zogbhi JF. (2008) Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. *Proc Am Thorac Soc.* 5, 23-31.
- Sgoifo RCA, Vandoni SL, Bonfanti M, Forbes AB. (2010) Effects of arrival medication with gamithromycin on bovine respiratory disease in feedlot cattle in Italy. *Intern J Appl Res Vet Med.* 8(2), 87-96.
- Steel HC, Theron AJ, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. (2012) Pathogen- and host- directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. *Mediators Inflamm.* ID 584262. doi:10.1155/2012/584262.
- Tamaoki J, Tagaya E, Sakai A, Konno K. (1995) Effects of macrolide antibiotics on neurally mediated contraction of human isolated bronchus. *J Allergy Clin Immunol.* 95(4), 853-859.
- Trak T, Yıldırım E, Yurdakök Dikmen B. (2019) The effect of gamithromycin on smooth muscle of rat uterus *in vitro*. *IJVAR.* 2(2), 46-50.
- Wang IY, Bai Y, Sanderson MJ, Sneyd J. (2010) A mathematical analysis of agonist- and KCl-induced Ca²⁺ oscillations in mouse airway smooth muscle cells. *Biophys J.* 98(7), 1170-1181.
- Wang Q, Yu M-F, Zhang W-J, Liu B-B, Zhao Q-Y, Luo X, Xu H, et al. (2019) Azithromycin inhibits muscarinic 2 receptor-activated and voltage-activated Ca²⁺ permeant ion channels Ca²⁺ and sensitization, relaxing airway smooth muscle contraction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 46(4), 329-336.
- Wang X, Tao YF, Huang LL, Chen DM, Yin SZ, Ihsan A, Zhou W, Su SJ, Liu ZL, Pan YH, Yuan ZH. (2011) Pharmacokinetics of tulathromycin and its metabolite in swine administered with an intravenous bolus injection and a single gavage. *J Vet Pharmacol Therap.* 35(3), 282-289.
- Zholos AV, Bolton TB, Dresvyannikov AV, Kustov MV, Tsvilovskii VV, Shuba MF. (2004) Cholinergic excitation of smooth muscles: multiple signaling pathways linking M2 and M3 muscarinic receptors to cationic channels. *Neurophysiology.* 36(5-6), 398-406.
- Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. (2011) Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycylicylines (tigecycline). *Med Clin N Am.* 95(4), 761-791.



İç Anadolu'da enfeksiyöz bronşit virüsü aşılmasının etkinliği

Gülşen Goncagül^{1*}, Özlem Kardoğan², Elçin Günaydın³

¹Bursa Uludağ Üniversitesi, Mennan Pasinli Atçılık Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye

²Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

³Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 17.09.2020, Kabul tarihi / Accepted: 19.10.2020

Özet: Enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV) kümes hayvanlarında solunum sistemini etkileyen, akut ve hızla yayılan, yumurta verim ve kalitesini etkileyerek ekonomik kayıplara neden olan bir virüstür. Dünya çapında bir dağılımı ve %100'e ulaşabilen yüksek morbidite oranı vardır. Araştırmamızda İç Anadolu Bölgesi'ndeki 11 yumurtacı kümeisten alınan, 599 adet kan örneği incelenmiştir. IBV ile aşılanan kümeslerden toplanan 599 adet kan serum örneğinde, bir kümeiste, düşük titre (842) ve yüksek CV (%84) (antikor titre değerlerinin sürü içindeki homojenitesi) saptanmıştır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde de iki kümeiste ise antikor titresini 2318 ve 1283 elde edilirken, %CV değerleri sırasıyla 93 ve 90 bulunmuştur. Diğer 8 kümeisten elde edilen antikor titrelerinin 1 ile 18903, %CV değerlerinin ise 0 ile 63 arasında değiştiği bulunmuştur. Sonuç olarak araştırmamıza dahil olan kümeslerden elde edilen antikor titreleri ve %CV değerlerine bakıldığında; yüksek antikor titreleri-yüksek %CV değerleri veya düşük antikor titreleri-yüksek %CV değerleri, halen ülkemizde aşılama ile ilgili sorunların varlığını göstermektedir. Bu durum kümeslerde arzu edilen homojen antikor titrelerine ulaşılmaması nedeniyle, kanatlı sürülerini enfeksiyon riskiyle karşı karşıya getirebileceği kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Aşı, ELİSA, Enfeksiyöz Bronşit

The efficacy of infectious bronchitis virus vaccination in Central Anatolia

Abstract: Infectious bronchitis virus (IBV) is an acute and rapidly spreading virus that affects the respiratory system in poultry, causing economic losses by affecting egg yield and quality. It has a worldwide distribution and a high morbidity rate reaching 100%. In our research, 599 blood samples collected from 11 laying flocks in Central Anatolian region were examined. In 599 blood serum samples collected from IBV vaccinated flocks, low titer (842) and high CV (84%) were detected in one of the flocks. When all results were evaluated, antibody titres of 2318 and 1283 were obtained in two flocks, while CV% values were found to be 93 and 90, respectively. It was found that antibody titers from the other 8 poultry houses ranged from 1 to 18903, and CV% values ranged from 0 to 63. As a result, when we look at the antibody titers and CV% values obtained from the poultry houses included in our study; high antibody titers-high CV% values or low antibody titers- high CV% values, indicated the existence of vaccination-related problems in our country. We believe that this may confronted poultry flocks at risk of infection due to the desired homogeneous antibody titres are not achieved in the poultry houses.

Keywords: Vaccination, ELISA, Infectious bronchitis

Giriş

Enfeksiyöz bronşit, kanatlı hayvan endüstrisindeki özellikle genç, yetişkin yumurtacı ve broiler tavukların, solunum ve ürogenital sistemlerinde lezyonlara yol açan bu nedenle karkas gelişimi, yumurta kalitesinde düşmeye neden olan prevalansı yüksek ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu akut, yüksek derecede bulaşıcı viral bir enfeksiyondur (Cavanagh ve Nagi 1997; de Witt ve ark. 2011).

IBV'u tek iplikçikli, RNA genomu içeren, zarflı bir korona virüsdür (Cavanagh 1997). Virusun, Spike (S) Glikoprotein, membran veya matrix (M) Glikoprotein, ve nükleokapsid (N) olmak üzere 3 adet spesifik proteinleri tespit edilmiştir. Çok önemli olan Spike Glikoprotein iki yapıda (S1 ve S2) olarak

görülmektedir (Cavanagh ve ark. 1986). IBV sık sık genotip ve antijenik özelliklerini, doku tropizmini, patojenitesini ve sonunda hastalığın seyrini değiştirir (Cook ve ark. 2012).

Enfeksiyöz bronşit (IB) tavukların oldukça bulaşıcı, akut solunum yolu hastalığıdır. Hastalık güçlükle soluma, öksürük, trakeal raller, hapşırma ve burun akıntısı ile karakterizedir. Genç hayvanlarda ciddi solunum sıkıntısı ve özellikle civcivlerde semptomlara ilave olarak burun akıntısı oluşturabilir (Esendal 2002). Her ne kadar bu virüs gerçekten solunum yolu hastalıklarına neden olsa da, solunum sistemi dışında böbrek ve genital sistem epitelyal hücrelerin çoğunda çoğalarak patolojik değişikliklere neden olabilirler (Boltz ve ark. 2004). Genital sistemde meydana

Yazışma adresi / Correspondence: Gülşen Goncagül, Bursa Uludağ Üniversitesi Mennan Pasinli Meslek Yüksekokulu Görükle Kampüsü Nilüfer-Bursa E-posta: goncagul@uludag.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-4331-9698 • ²0000-0002-6457-3292 • ³0000-0002-5247-7578

na getirdiği patolojik değişiklikler yumurta veriminde azalma, yumurta kalitesinde ve yumurta kabuğu kalitesinde bozulmalarına neden olan yumurtalık hasarlarına neden olmaktadır. Diğer taraftan virüsün bazı variant suşlarının böbreklerde meydana getirdiği hasar ise, yüksek ölümlerin nedeni olabilir (OIE 2000). Ölümler çoğunlukla solunum sistemine yerleşen başta *Escherichia coli* olmak üzere *Mycoplasma* spp. gibi bakteriyel kaynaklı sekonder enfeksiyonlar sebebiyle olur (Cavanagh 2003). Bunun yanında enfeksiyöz bronşitis, kanatlı hayvanlarda canlı ağırlık kayıplarına, yem dönüşüm oranlarının azalmasına, damızlık sürülerde yumurta üretimini ve kuluçka verimini olumsuz etkileyerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cook 2002).

IB virusunun genetik yapısını hızlı ve kolay bir şekilde mutasyona uğratması nedeniyle farklı serotiplerin tanımlanmasını ve enfeksiyonun aşı ile kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır (Cavanagh ve ark. 1992; Lee and Jackwood 2000). IB virusunun Massachusetts ve Connecticut suşlarının solunum sistemine, T, Gray ve Holte suşlarının böbreklere affinite gösterdiği bilinmektedir (Cook ve ark. 2012). IB 4/91 susunun yaşlı tavuklarda ölüm ve %50'ye varan yumurta verim kaybına sebep olduğu İngiltere'de rapor edilmiştir (Ballal ve ark. 2005). IB, tavuk sürülerinin aşılansıyla kontrol edilebilir ancak virüsün farklı suşlarıyla yapılan sürü aşılamlarında antijenik olarak ilişkili olmayan serotiplere karşı çapraz koruma bulunmamasından dolayı aşılansmış sürülerde hala enfeksiyonlar çıkabilmektedir (Cardoso

ve ark. 2006; Jia ve ark. 1995). Ülkemizde halen Connecticut, H120, Ma5 ve M41 gibi farklı suşlarla enfeksiyöz bronşite karşı aşılama yapılmasına rağmen Türkiye'de halen birçok IB şüpheli salgınlar yaşanmaktadır (Kahya ve ark. 2013).

IB tanısı klinik bulgulara, öyküye, lezyonlara, serokonversiyon veya antikor seviyelerine, virüs izolasyonuna ve viral RNA'nın saptanmasına dayanır (Cavanagh ve Naqi 1997). IBV, yüksek derecede immünojeniktir ve enzime bağlı immünosorban (ELISA) testi ile tespit edilebilen antikorların üretimini uyarır. Bu nedenle ELISA IBV'ye özgü antikor seviyelerini ölçmek için muhtemelen en sık kullanılan analizdir (Okino ve ark. 2014).

Bu çalışmanın amacı, günümüzde Türkiye'de İç Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen yumurtacı sürülerde ELISA'yla IBV'ye özgü antikorların varlığı ile aşılama etkinliğini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Gereç

Çalışma materyali olarak, IBV karşı aşılansmış, İç Anadolu Bölgesi'nin farklı illerinde (Ankara, Eskişehir, Çorum) bulunan 11 yumurtacı sürülerden alınan 599 adet kan örneği kullanılmıştır. Alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuvarına getirilmiştir. Kan örneklerinin serumları santrifüj yoluyla ayrılarak ELISA uygulanıncaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Tablo 1. Aşılar ve Aşılama Programı

Sürü No	Yetiştirme Tipi	Yaş (Hafta)	Numune Sayısı	Kullanılan Aşılar ve Uygulama Sayısı		
				1.(Aktif)	2. (Aktif)	1.(İnaktif)
1	Yumurtacı	25	225	Ma5 + Clone 30	IB H120	COR4+IB+ND+EDS
2	Yumurtacı	12	29	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
3	Yumurtacı	15	24	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
4	Yumurtacı	14	75	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
5	Yumurtacı	13	78	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
6	Yumurtacı	12	25	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
7	Yumurtacı	10	28	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
8	Yumurtacı	9	26	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
9	Yumurtacı	14	26	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
10	Yumurtacı	12	40	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
11	Yumurtacı	11	23	Ma5 + Clone 30	Ma5 + Clone 30	
Toplam Serum Sayısı			599			

Yöntem

ELISA Kiti

Çalışmamızda BIOCHEK firmasına ait BioChek "Infectious Bronchitis Antibody Test Kit®" (Katalog kodu CK 119) ELISA kitleri kullanılmıştır.

Uygulama

Yukarıda aşılama programı verilmiş tavuk serum örnekleri teste başlamadan önce 1:500 oranında sulandırıldı. Kit içinde bulunan negatif kontrol, pozitif kontrol ve sulandırılmış serum örnekleri (100 µl), inaktive edilmiş IBV antijeni ile kaplanmış mikrop-leyt gözlerine ayrı ayrı usulüne uygun olarak eklendi. Pleytlerin A1 ve B1 çukurlarına 100 µl negatif kontrol serumu konuldu. C1 ve D1 gözlerine 100 µl pozitif kontrol serumu konuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Böylece, IBV antikorlu içeren serum örnekleri pleyt gözlerine IBV antijenlerine bağlanarak antijen-antikor kompleksleri oluşturuldu. Pleyt gözlerindeki içerikleri aspire edilerek 4 kez yıkama solüsyonu (her bir göz için 350µl) ile yıkandı. Pleytler kurutma kağıtlarına ters çevrilerek fazlalıklar alındı. Böylece, özel yıkama solüsyonu ile pleytin yıkanması sonucunda non spesifik antikorlar ve diğer serum proteinleri ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra pleytlere 100 µl olacak şekilde konjugat reagent uygulandı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Konjugat reagent (alkalin fosfat enzimi ile etiketlenmiş anti-chicken IgG) eklenerek orijinal tavuk IBV antikorları bağlanmaktadır. Tekrar her bir pleyt gözleri 4 kez yıkandı. Bu yıkama işlemi ile işlevi tamamlamış konjugat ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. pNPP (p-Nitrofenil fosfat) formundaki substrat, boya olarak eklendi. Her bir pleyt gözleri 100 µl substrat eklenerek 15 dakika oda ısısında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 100µl olacak şekilde pleyt gözlerine durdurma solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk, serum örneklerindeki antikor miktarına bağlı olarak yoğunluk göstermektedir. Kit üreticisi firmanın önerileri doğrultusunda, Optik dansite (OD) Bio Tek ELx808 Marka ELISA Reader'da 405 nm'de okundu. Değerlendirme kit üreticisi firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen ELISA sonuçları, aşı etkinliği yönünden değerlendirildi.

Bulgular

Yumurtacı sürülerden toplanan 599 kan serumunun indirekt ELISA yöntemi ile antikor titresi sonuçları elde edilmiştir. %CV olarak gösterilen değer, antikor titre değerlerinin sürü içindeki homojenitesini göstermektedir. Hesaplanan CV değeri ne kadar küçük-

se, sürü antikor titre değerleri açısından o kadar homojendir ya da değer ne kadar büyükse sürü antikor titre değerleri o kadar heterojendir. Biz değerlendirmemizde uygun % CV değeri 45 olarak belirledik (Tablo 2).

Tablo 2. Enfeksiyöz bronşit hastalığı için ELISA titre ve %CV değerleri (Dilüsyon 1:500)

Sürü No	Kan Serum Adedi	IBV Ortalama % CV	Yorum
1	225	12620	42 Titre yeterli-CV normal
2	29	3574	93 Titre yeterli- CV yüksek / aşılama sorunu
3	24	7204	45 Titre yeterli-CV normal
4	75	2009	90 Titre yeterli-CV yüksek / aşılama sorunu
5	78	5407	56 Titre yeterli-CV normal
6	25	11008	33 Titre yeterli-CV normal
7	28	1139	84 Titre düşük-CV yüksek/ aşılama sorunu
8	26	8951	26 Titre yeterli-CV normal
9	26	2224	51 Titre yeterli-CV normal
10	40	7079	45 Titre yeterli-CV normal
11	23	3651	40 Titre yeterli-CV normal

Çalışmamızda 11 sürünün tamamına enfeksiyöz bronşite karşı 2 aktif aşılama uygulandığı (1. uygulama ilk hafta, 2. uygulama 3. veya 4. hafta) sadece test edilen bir sürüde inaktif aşı yapıldığı öğrenilmiştir. Numune alınan 1. sürüde, Ma5 + Clone 30, IB H120 aktif ve inaktif (COR4+IB+ND+EDS) aşılama uygulanmıştır. Bu sürüde antikor titresinin yüksekliği inaktif aşılanmanın olmasına bağlanmıştır. Aşılama yapılmış 2. ve 4. sürülerde ortalama titre yeterli iken yüksek CV (%93 - %90) bulunması bu firmalarda aşılama sorununun olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca 7. sürüde Ma5 + Clone 30 ile aşılamada beklenen titre düzeyi alt seviyede olması buna karşın, yüksek CV (% 84) değeri bu firmada da aşılama sorununu gündeme getirmiştir. Aktif aşılama (Ma5 + Clone 30) yapılan diğer sürülerde ortalama antikor titreleri 2224 ile 11008 arasında bulunmuştur. Ortalama titreleri yeterli bulunan sürülerde elde edilen %CV değerleri 26 ile 56 arasında kabul edilebilir sınırlarda bulunmuştur. Sürü 6'ya ait olan numunelerde ortalama antikor titresi 11008 bulunarak yüksek görülmele birlikte %CV bakımından %33 ile düşük CV'ye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sürü ile ilgili daha fazla detay bilgi sağlanabilseydi uygun görülen ortalama titre değerinin tam açıklaması ifade edilebilirdi. Aşılamanın olduğu 11 sürünün 8'inde enfeksiyöz bronşite karşı yeterli ortalama antikor titresi ve %CV

değerinin olduğu, diğer 3 sürüde ise aşılama sorunu olduğu ve/veya muhtemelen diğer IBV varyantlarının varlığı dikkati çekmektedir (Tablo 2).

Tartışma ve Sonuç

Enfeksiyöz bronşit dünyada ve ülkemizde kanatlı endüstrisindeki yumurta üretim miktarı ve kalitesini etkileyen en önemli viral enfeksiyonlardan biridir. Tavukçuluk endüstrisinde sürülerde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonun kontrolünde sıkı biyogüvenlik önlemleri ile birlikte kanatlıların IBV suşlarına karşı direncini arttırmak için aşılamanın büyük etkisi söz konusudur (Cook 2008).

Kanatlı yetiştiricileri düzenli aşılama yapmalarına rağmen, IBV salgınları sık görülür ve enfekte kümeslerde çok büyük ekonomik kayıplara neden olur. IBV antikor tespiti ve serolojik profil belirleme çalışmalarında, duyarlılık açısından diğer geleneksel serolojik testlere kıyasla spesifikliğı ile ELISA tercih edilmiştir (Bronzoni ve ark. 2005). Aşılama özellikle viral enfeksiyonların kontrolünde en önemli adımdır. Aşılamanın immunizasyonunu, sürünün aşılama takvimi, sürü için seçilen aşı tipi, aşının uygulama yolu, uygulama tekniğı, aşılanan kanatlının sağlığı ve aşı ekibinin uygulama becerisi etkilemektedir. Saha da uygulanan aşı programları enfeksiyöz bronşitin bölgedeki durumu ve aşılanacak sürünün durumuna göre farklılık gösterebilir. Bunların yanında saha şartları altında yapılan aşılamalarda, çiftlikteki hijyen şartları ve sevk idare yöntemleri de büyük önem taşıdığı için aşılarından tam anlamıyla koruma beklemek gerçekçi olmayacaktır. Çalışmamızda numunelerimizin alındığı İç Anadolu Bölgesi'nde enfeksiyöz bronşit için en yaygın kullanılan aşı suşları MA5, H120'dir. Çalışmamıza dahil olan 11 sürünün tamamına Ma5 + Clone 30 bivalan aşılama yapılmıştır. Enfeksiyöz bronşite karşı aşılamalar sonucunda 11 sürüden 10'unda elde edilen antikor titreri yeterli bulunmuş ancak, aşılama uygulamalarının ELISA sonuçları değerlendirildiğinde her ne kadar antikor titreri yeterli olsa da, 3 sürünün antikor titreri içindeki dağılımının homojen olmaması nedeniyle enfeksiyon riskinin varolduğunu düşündürmektedir. Cardoso ve ark (2005) 8 deney grubunda yaptıkları çalışmada, polivalan aşılarla aşılanan sürülerle monovalan aşılarla aşılananlarla sürüler karşılaştırdıklarında, polivalan aşılamalarda aşı etkinliğinin farklı olduğu ve aşılamalardan sonra gerekli korumanın gerçekleşmediğı sonucuna varmışlardır. Çalışmamızdaki sürülerde hem ND hem de IB aşıları aynı anda uygulanmıştır. Aşılama sonrası elde edilen düşük titrenin aşılar arası interferensten

kaynaklandığını düşünülmüştür. Aşılar arası interferensin nedeni, ND ve IB aşılarının her ikisi de solunum sisteminde bulunan epitel hücreleri etkilemesi ile açıklanmıştır (Gelb ve ark. 2004).

Cook ve ark. (2001) IBV'nin sadece NDV ile etkileşime girmediğini, diğer Paramyxovirus ve Avian Pneumovirus grupları ile de ilişkide olabileceğini bildirmiştir. Bunun yanında enfeksiyöz bronşitis virüsünün sıklıkla genotipini değiştirmesi ve sahada bulunan IBV'ler arasındaki yüksek antijenik varyasyon nedeniyle, IB'ye karşı etkili bir aşılama programı oluşturmak oldukça zordur (Cook 2012). 2018 yılında İran'da yapılan bir çalışmada, IBV'nin QX suşuna karşı uygulanan H120 ve Ma5 aşılarının virüse karşı çapraz koruma sağlayamadığı ve baskın genotiplerin IS-1494 benzeri IBV, 793/B tipi, Massachusetts ve QX tipi olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda da uygulanan H120 ve Ma5 aşıları sonrasında, 3 sürünün antikor titreri içindeki dağılımının yeterli olmaması çapraz koruma yönlü değerlendirilebilir. Aynı zamanda bölgesel baskın genotiplerin belirleneceğı çalışmalar yapılarak, bu tiplere karşı çapraz koruma sağlanabileceğı, aşılama programlarıyla çiftliklerimizdeki viral yükü azaltılabileceğı öngörülmektedir. IB'nin kontrol stratejisi aşılamaya dayanır. Bu nedenle canlı ve inaktif aşılar kullanılmıştır. Bölgesel aşı programları değişebilmektedir. Her ne kadar katı biyogüvenlik ve tek yaş sistemiyle kanatlı yetiştiriciliğı yapmak gibi temel kontrol önlemleri olsa da, tavukların IBV suşlarıyla mücadeleye karşı direncini arttırmak için aşılama kesinlikle gereklidir.

Aşılama, 50 yıldan uzun bir süredir IBV'yi kontrol etmek için bir önlem olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, halen devam etmekte olan attenu canlı veya inaktif aşılar, virüsün mutasyon veya rekombinasyon olayları kaynaklı, hızla ortaya çıkan varyant suşları ile mücadelede etkili olmadığı için zorluk devam etmektedir. Bunlara ilave olarak kullanılmakta olan canlı attenu aşılar, yeni patojenik IBV varyantlarının ortaya çıkmasına katkıda bulundukları için güvenlik endişesini artırmaktadır (Awad ve ark. 2014; Bande ve ark. 2015; McKinley ve ark. 2008).

Epidemiyolojik açıdan 2000 yıllardan bu yana IBV saha suşlarında virüs değişikliklerini anlamak için, izolasyon ve tiplendirme çalışmaları yapılmaktadır. İran'ın Fars eyaletinde bölgesel aşılama başarısızlığı ile ilgili IBV varyantlarını tespit etmek için epidemiyolojik bir araştırmada, 793/B serotipiyle ilişkili IRFIBV32 suşu, izole karakterize edilmiştir (Broomand ve ark. 2011). Ahmed ve ark. (2007) yaptığı çalışmada, dünya çapında çok sayıda IBV

serotipi bildirilmektedir. Tunus'ta yapılan bir çalışmada, ticari H120 aşısının neden olduğu bağışıklık tepkisinden kaçınılabilecek yeni IBV varyantlarının varlığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada CR88 (793B tipi) ile H120 aşıları arasında immünolojik yanıt araştırıldığında, H120 tarafından sağlanan düşük koruma rapor edilmiştir (Bourogâa ve ark. 2009). Buna karşın çalışmamızda sürülerde sadece 1 numaralı sürünün H120 ile aşıllı olduğu ve sürüde yeterli titre elde edildiği görülmüştür. Karimi ve ark. (2018)'nin yaptığı çalışmada; sahada IBV'nin civcivleri yaşamın ilk haftasında enfekte etmesi ve civcivlerin bir gün önce H120 veya Massachusetts IB aşıları kullanılarak aşılanması durumunda, civcivlerin tam koruma seviyesine ulaşamadığını, ancak viral yükün ve patolojik hasarlar azaltılarak IBV'ye karşı göreceli koruma sağlanabildiğini belirtmişlerdir. H120 aşısının, Belçika B1648, Fransız 84084 ve Fransız 84221 serotipleri ile heterolog mücadeleye karşı solunum yolunun bir miktar korunmasını indüklediği bulunmuştur (Cook ve ark. 1999).

Çalışmamızda numune alınan bölgede ve ülkemizde halen aşılamalara rağmen bu enfeksiyonun görülüyor olması, yeni enfeksiyöz bronşit (IB) varyant virüslerinin ortaya çıkması ve/veya çeşitli IB suşları arasında çapraz koruma olmaması ilişkilendirilebilir (Cavanagh 1997). Cook ve ark. (1999) sadece bir serotip ile aşılanmanın heterolog IBV suşlarına karşı tam bağışıklığı indükleyemediğini, ancak akut heterolog IBV varyantına karşı çeşitli IBV canlı aşıları, proktotip suşlarının bir kombinasyonu kullanılarak daha yüksek bağışıklık sağlanabileceğini gösterdi. Kahya ve ark.'nın (2013) çalışmasında, H120 aşısının bir günlük civcivlere bir kez uygulanmasının, Orta Doğu 885 ve 1494 IBV suşlarına karşı korumasının bulunmadığı belirtildi. Jackwood ve ark. (2003) yeni IBV varyantının ticari aşı olarak üretim zorluğuna, yüksek masraflar ve ürün validasyonları açısından zaman alıcı ve maliyetli olduğuna değinmiştir. Dünya çapında IBV'nin farklı iyi çapraz koruyucu olmayan antijenik varyantının yaygınlığının artması, etkili bir aşılama programı tasarlama sorunu giderek zorlaşmaktadır. Massachusetts IB aşı serotipi olan H suşunun, heterolog serotiplere karşı çapraz koruma sağlama yeteneği ile daha geniş bir serotip yelpazesini kontrol etmek için potansiyel olarak etkili olduğu bildirilmiştir (Bijlenga ve ark. 2004). Massachusetts serotip aşısının saha izolataına karşı koruma sağladığını, ancak heterolog bir aşı kullanılarak daha iyi koruma sağlanabileceği belirlenmiştir (Shapouri ve ark. 2004; Roussan ve ark. 2008). Enfeksiyöz bronşitisten korunma da, doğru aşı serotipinin seçimi, genellikle zordur (Cook ve ark. 1999).

Bu nedenle, saha ve aşı IBV suşları arasındaki antijenik ilişkilerin değerlendirilmesi, esas olarak kanatlılarda laboratuvar çapraz okuma çalışmalarını içeren standart yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir (Bourogâa ve ark. 2014). Bhuiyan ve ark. (2018) Bangladeş'in 4 bölgesinde yaptıkları çalışmada, yumurtacılar en yüksek ortalama IBV antikor titresini 8919.70, %CV 58,86 bulmuşlardır. Çalışmamızda ise 11 sürüden 3'ü IBV antikor titresini yönünden bu çalışmadan yüksek bulunurken, %CV değerleri bu sürülerden daha düşük bulunmuştur. Yüksek antikor titresini, farklı yaşlarda tekrarlanan canlı ve inaktif IBV aşılamadan kaynaklanabilir (Bhuiyan ve ark. 2018).

De Herdt ve ark (2001) piliçlerde IBV enfeksiyonlarıyla ilişkili ekonomik kayıplara, ağırlıklı olarak düşük ve düzensiz maternal antikor titrelerinin neden olduğunu ve broyler yetiştiricilerinde IBV aşılama stratejilerinin yüksek ve tek tip antikor titrelerini hedeflemesi gerektiği sonucuna varmışlardır. Diğer yandan ise yeterli aşılama için, maternal antikor titrelerinin dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır. Genel olarak, maternal bağışıklığın bir dereceye kadar aşı virüsünü nötralize edebileceği söylenirken, ancak IB aşılamasından sonra bağışıklık sistemi uyarımının genel sonucunu maternal antikorun etkilemediğini bildirilmektedir (Marcin ve ark. 2017). Diğer bir çalışmada ise civcivlerde, maternal antikorun IgG sınıfında olduğu, yumurta sarısının bağırsaktan emiliminden sonra sistemik hale geldiği bildirilmiştir. Anneden gelen IgG, civcivin solunum yolunda bulunabilir, ancak IgA ile karşılaştırıldığında korumadaki rolü daha az etkili olduğu bildirilmektedir (Cardoso ve ark. 2006). Diğer araştırmalarda ise, maternal antikorların bir günlük civcivlere uygulanan IB aşılarında etkin olduğu bildirmişlerdir (Cardoso ve ark. 2006). Çalışmamızda 3 hafta ara ile aktif aşılama yapılmıştır. Çoğunlukla sürülerde yeterli antikor titresinin saptanmasıyla sürülerde yüksek veya düşük maternal antikorlara titrelerine göre, birinci aşılamının nötralizasyonunu ve ikincisinde farklı bir yanıt teşvik ettiğini düşünmekteyiz (Cardoso ve ark. 2006).

Okino ve ark. (2013) bir günlük civcivleri çeşitli dozlarda atenüe canlı aşılarla aşılandıktan sonra IBV'ye karşı hücrel ve humoral bağışıklık tepkileri üzerine yaptıkları çalışmada; lakrimal sekresyonlar ve trakeadaki IgG ve IgA antikor düzeylerinin aşılamadan 5 gün sonra önemli ölçüde arttığını belirtmiştir. Bununla birlikte, aşı tam dozda uygulanmadığında, eksik bağışıklık tepkisi olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, membranlarda tam doz IB aşılamasından sonra indüklenen IgA, IgG ve CD8TM T hücre yanıtlarının, antiviral koruyucu bağışıklık ile iyi korele olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, önceki çalışmalar-

da olduğu gibi, uygun koruyucu bağışıklık tamamen aşı dozuna bağlı olduğu vurgulanmıştır (Okino ve ark 2013). Bu durum yetersiz doz uygulamayla aşılama yapılan sürülerde enfeksiyon görülmesinin önemli bir nedeni olabilir. Çalışmamızda 3 sürüde yeterli bağışıklığın bulunmamasının bir nedeni de aşı uygulama eksikliğini düşündürmektedir. Enfeksiyöz bronşitise karşı aşılama ve/veya enfeksiyonu takiben kanatlılarda humoral ve hücrel bağışıklık sistemi uyarılır. IBV'ye karşı humoral antikor durumunun koruma ile tam olarak ilişkili olmadığını bilinmektedir. Enfeksiyöz bronşitise karşı üst solunum yollarının korunmasında humoral bağışıklıklığın bir işlevi olmasa da, üst solunum yolu dışındaki yapılarda IBV replikasyonunun inhibisyonunu sağlar (Cook ve ark. 1991; Gelb ve ark. 1998; Van Ginkel ve ark. 2008). Enfeksiyöz bronşitten korunmada hücrel bağışıklık belirleyici bir faktör olarak kabul edilir (Cook ve ark. 2012). Aşılanmış kanatlıların serum antikor titresinden bağımsız olarak IBV'ye karşı solunum enfeksiyonundan korunması mukozal bağışıklığa bağlanmaktadır. Kan antikorları IBV enfeksiyonlarına karşı çok etkili olmasa da, kandaki yüksek antikor seviyeleri solunum yolu mukozasına "sızma" ve böylece koruma sağlama potansiyeline sahiptir (Ignjatovic ve Galli 1994, Jackwood 2010). Sahada, hayvancılık ve yönetim koşullarının arzulan ölçüde olmaması ve viral enfeksiyonlara sekonder bakteriyel enfeksiyonların katılmasıyla viral enfeksiyonların şiddeti artmaktadır (Matthis ve ark. 2003). Farklı araştırmalarda aşıli sürülerle, aşısız sürüler arasında karkas gelişimi karşılaştırıldığında, aşısız sürülerin canlı ağırlık artışının olumsuz etkilendiği bildirilmektedir. Bu durum IB enfeksiyonunda ekonomik olumsuzluğun diğer bir etkisidir (Otsuki ve ark. 1990; Ignjatovic ve Sapats 2000).

Çalışmamızda enfeksiyöz bronşite karşı yumurtacı sürülerde rutin aşılama etkinliği araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar; enfeksiyöz bronşite karşı yapılan aşılamaların virüse karşı önemli ölçüde koruma sağladığını göstermiştir. Bununla birlikte, aşılama başarısızlığının görüldüğü sürülerde, muhtemelen diğer IBV varyantlarının veya standart altı yönetim uygulamalarının varlığının neden olduğu kanaatindeyiz.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu çalışma, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu'nun 10.07.2020 tarih ve 2020/12 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

Kaynaklar

- Ahmed Z, Naeem K, Hameed A. (2007). Detection and seroprevalence of infectious bronchitis virus strains in commercial poultry in Pakistan. *Poult Sci.* 86, 1329-1335.
- Awad F, Chhabra R, Baylis M, Ganapathy K. (2014). An overview of infectious bronchitis virus in chickens. *Worlds Poult Sci J* 70, 375.
- Ballal A, Karrar AE, ElHussein AM. (2005). Serosurveillance study on avian infectious bronchitis virus in Sudan. *J Anim and Vet Advances.* 4(11), 908-909.
- Bande F, Arshad SS, Bejo MH, Moeini H, Omar AR. (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J Immunol Res.* 424860. <https://doi.org/10.1155/2015/424860> PMID: 25954763].
- Bhuiyan ZA, Giasuddin MD, Uddin Z, Khan M. (2018). Seroprevalence of infectious bronchitis virus in different types of chicken in Bangladesh. *Asian J Med Biol Res.* 4 (1), 132-136; doi: 10.3329/ajmbr.v4i1.36831
- Bijlenga G, Cook JKA, Gelb J, De Wit JJ. (2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: A review. *Avian Pathol*, 33, 550-557.
- Boltz DA, Nakai M, and Bahra JM. (2004). Avian infectious bronchitis virus: A possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.* 48, 909-915.
- Boroomand Z, Razeghian I, Asasi K, Mohammadi A, & Noohadani AH. (2011). Isolation and identification of a new isolate of avian infectious bronchitis virus IRFIBV32 and a study of its pathogenicity. *Online J of Vet Res.* 15, 366-80.
- Bourogâa H, Miled K, Larbi I, Nsiri J, Gribaa L, Behi I, Benrhouma W, Allegui F, Sassi H, Ghram A. (2009). Avian infectious bronchitis disease in Tunisia: seroprevalence, pathogenicity and compatibility studies of vaccine-field isolates. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 86, 75-83.
- Bourogâa H, Larbi I, Miled K, Hellal YK, Hassen J, Behi I, Nsiri J, Ghram A. (2014). Evaluation of protection conferred by a vaccination program based on the H120 and CR88 commercial vaccines against a field variant of avian infectious bronchitis virus. *J Appl Poult Res.* 23, 156-164. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2013-00828>.
- Bronzoni RV, Fatima M, Montassier S, Pereira GT, Gama NM, Sakai V, Montassier HJ. (2005). Detection of infectious bronchitis virus and specific anti-viral antibodies using a Concanavalin A-Sandwich-ELISA. *Viral Immunol.* 18, 569-578.
- Cardoso WM, Aguiar JLC, Romão JM. (2005). Effect of Associated Vaccines on the Interference between Newcastle Disease Virus and Infectious Bronchitis Virus in Broilers. *Brazilian J of Poultry Science.* 3, 181-184.
- Cardoso WM, Gomes LP, Romão JM, Salles RPR, Teixeira RSC, Sobral MHN, Câmara SR, Oliveira WF. (2006). Antibodies specific to infectious bronchitis in broilers in Ceará state. *Brazil Arq Bras Med Vet Zootec.* 58(3), 327-332.
- Cavanagh D, Davis PJ, Pappin DJ, Binns MM, Boursnell ME, Brown TD. (1986). Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res.* 4, 133-143.
- Cavanagh D, Davis PJ, Cook J. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol.* 21, 401-408.
- Cavanagh D. (1997). Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol.* 142, 629-633.

- Cavanagh D. & Naqi SA. (1997). Infectious bronchitis. In B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid & H.W. Yoder Jr. (Eds.), Diseases of Poultry 10th edn p. Ames, IA: Iowa State University Press. P. 511-526.
- Cavanagh D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experience of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32(6), 567-582.
- Cook JK, Davison TF, Huggins MB, McLaughlan P. (1991). Effect of in ovo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C White Leghorn chickens. *Arch Virol.* 118, 225-34.
- Cook JK, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28(5), 477-85.
- Cook JKA, Huggins MB, Orbell SJ, Mawditt K, Cavanagh D. (2001). Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathol.* 30, 233-242.
- Cook J. (2002). Coronaviridae. In: Jordan, F; Pattison, M; Alexander, D and Faragher, T (Eds.), Poultry diseases. (5th. Edn.), London, W. B. Saunders Co. P. 298-306.
- Cook JKA. (2008). Coronaviridae. In: Pattison M, Bradbury A, editors. Poultry diseases. 6th ed. Amsterdam: Saunders Elsevier. p. 340-349.
- Cook JKA, Jackwood M, Jones RC. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41, 239-50.
- de Herdt P, Ducatelle AR, Uyttebroek AE. (2001). Infectious bronchitis serology in broilers and broiler breeders: correlations between antibody titers and performance in vaccinated flocks. *Avian Dis.* 45, 612-619.
- de Wit JJ, Cook JKA, Van Der Heijden HMJF. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223-235.
- Esendal MÖ. (2002). Enfeksiyöz Bronşitis, Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Editörler: İzgür.M., Akan.M., Medisan Yayınları.50. Ankara, s: 155-162.
- Gelb JJ, Nix WA, Gellman SD. (1998). Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. *Avian Dis.* 42, 364-74.
- Gelb JJr, Campion L, Ladman B. (2004). Interferência na replicação entre os vírus dabronquite infecciosa e da doença de Newcastle. In: Anais vol.1 da Conferência Apinco de Ciência e Tecnologias Avícolas. São Paulo-Brasil. p., 63-70.
- Ignjatovic J Galli L. (1994). The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archives of Virol.* 138, 117-134.
- Ignjatovic J & Sapats S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Révue Scientifique et Technique (Office Internationaldes Epizooties).* 19, 493-508.
- Jackwood MW, Hilt DA, Brown TP. (2003). Attenuation, safety, and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine. *Avian Dis.* 47(3), 627-32.
- Jackwood MW. (2010). Control of Arkansas infectious bronchitis virus by vaccination. *Avian Insight.* 3, 1-4.
- Jia W, Karaka K, Parrish CR. (1995). A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch Virol.* 140, 259-271.
- Kahya S, Çöven F, Temelli S, Eyigör A, Çarlı KT. (2013). Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 60,27-31.
- Karimi V, Ghalyanchilangeroudi A, Hashemzadeh M, Rahimi F, Petroudi MTZ, Farahani RKH, Maghsoudloo H, Abdollahi H, (2018). Efficacy of H120 and Ma5 avian infectious bronchitis vaccines in early challenge against QX strain. *Virus Dis.* 29(1),123-126 <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0414-4>
- Lee CW, Jackwood MW. (2000): Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch Virol.* 145, 2135-2148.
- Marcin S, Bartłomiej T, Daria D, Tomasz S, Andrzej K. (2017). Immunological aspects of the efficiency of protectotype vaccination strategy against chicken infectious bronchitis. *BMC Veterinary Res.* 13,44 DOI 10.1186/s12917-017-0963-1)
- Matthijs MGR, Van Eck JHH, Landman WJM, Stegeman JA. (2003). Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: A comparison between vaccine and virulent field virus. *Avian Pathol.* 32, 473-481.
- McKinley ET, Hilt DA, Jackwood MW. (2008). Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine.* 26, 1274- 1284. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.006> PMID: 18262691)
- OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties, World Organisation for Animal Health, Paris. 2000. www.oie.int Erişim Ağustos 2020)
- Okino CH, Alessi AC, Montassier MDFS, Rosa AJDM, Wang X, Montassier HJ. (2013). Humoral and cell-mediated immune responses to different doses of attenuated vaccine against avian infectious bronchitis virus. *Viral Immunol.* 26(4),259-67
- Okino CH, dos Santos IL, Fernando FS, Alessi AC, Wang X, Montassier HJ. (2014). Inflammatory and cell-mediated immune responses in the respiratory tract of chickens to infection with avian infectious bronchitis virus. *Viral Immunol.* 27, 383-9.
- Otsuki K, Huggins MB, Cook JKA. (1990). Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens. *Avian Pathol.* 19, 467-475.
- Roussan DA, Totanji WS, Khawaldeh GY. (2008). Molecular subtype of infectious bronchitis virus in broiler flocks in Jordan. *Poult Sci.* 87, 661-664.
- Shapouri S, Mayahi MR, Asasi MK, Charkhar S. (2004). A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4.91 in Iran. *Acta Vet Hungarica.* 52, 163-166.
- van Ginkel FW, van Santen VL, Gulley SL, Toro H. (2008). Infectious bronchitis virus in the chicken Harderian gland and lacrimal fluid: Viral load, infectivity, immune cell responses, and effects of viral immunodeficiency. *Avian Dis.* 52, 608-17



Osmaniye yöresindeki köpeklerde Anti-*Neospora caninum* antikorlarının araştırılması

Armağan Erdem Ütük^{1*}, Bünyamin Akın²

¹ Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

² Osmaniye Belediyesi, Veteriner İşleri Müdürlüğü, Osmaniye, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.09.2020, Kabul tarihi / Accepted: 16.10.2020

Özet: *Neospora caninum* Apicomplexa şubesinde yer alan parazitik bir protozondur. Son konakları canidae ailesinde bulunan carnivorlar, ara konakları ise sığır başta olmak üzere, koyun, keçi, manda ve at gibi çiftlik hayvanlarıdır. Hastalık köpeklerde nöromusküler bozukluklar, multifokal sistemik yayılım ve dermal semptomlara, sığırlarda ise abort, ölü doğum, fetal ölümler ve sonuçta ciddi ekonomik kayıplara neden olur. Bu çalışmanın amacı Osmaniye yöresindeki köpeklerin *N.caninum*'a maruziyet durumlarını belirlemektir. Bu amaçla Osmaniye'nin farklı ilçelerinden 71'i erkek ve 34'ü dişi olmak üzere toplam 105 köpekten kan örnekleri alınarak *N.caninum* antikorlarına karşı Enzyme-linked immunosorbent asay (c-ELISA) yöntemi ile test edildi. Etkenin ortalama seroprevalansı %35,23 (37/105) olarak belirlendi. Çalışmada *N.caninum* seroprevalansı ile ırk, cinsiyet ve yaş arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$). Bu çalışma ile Osmaniye yöresindeki köpeklerin etkene maruziyet durumu ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: c-ELISA, Köpek, *Neospora caninum*, Osmaniye.

Investigation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in Osmaniye province

Abstract: *Neospora caninum* is a parasitic protozoon in the phylum Apicomplexa. The definitive hosts of the agent are carnivores in the family canidae and intermediate hosts are mainly cattle and farm animals such as sheep, goats, buffalo and horses. The disease causes neuromuscular disorders, multifocal systemic spread, and dermal symptoms in dogs, while in cattle, abortion, stillbirth, fetal deaths, and consequently serious economic losses. The purpose of this study was to determine the exposure status of the dogs to *N.caninum* in Osmaniye region. For this, blood samples were taken from 105 dogs (71 males and 34 females) from different districts of Osmaniye, and tested with c-ELISA method against *N.caninum* antibodies. The average seroprevalence of the agent was determined as 35.23% (37/105). As a result of statistical analysis, it was determined that the relationship between *N.caninum* seroprevalence and race, gender and age was insignificant ($p>0.05$). With this study, the exposure status of dogs to the *N.caninum* was revealed for the first time in Osmaniye region.

Keywords: c-ELISA, Dog, *Neospora caninum*, Osmaniye.

Giriş

Neospora caninum, Apicomplexa şubesinde yer alan, zorunlu hücre içi parazitik bir protozondur. Parazitin doğada bilinen son konağı canidae'ler, ara konakları ise çiftlik hayvanlarıdır ayrıca etken birçok yabani memeli ve kanatlının çeşitli organ ve dokularında tespit edilmiştir (Dubey ve ark., 2017; Lindsay ve Dubey, 2020).

Hastalığın domestik siklustaki en önemli son konağı köpek ve ara konakları ise sığırlardır. Bu iki canlı arasındaki döngü ciddi klinik semptomlardan ve ekonomik kayıplardan sorumludur (Reichel ve ark., 2003; Utuk ve Eşki, 2019).

Köpeklerde hastalık genellikle asemptomatik seyrederek ancak çok genç, çok yaşlı ve bağışıklık sistemi baskılanmış köpeklerde hastalık farklı düzeylerde ortaya çıkabilir. Kongenital enfekte köpek

yavrularında genellikle doğumdan sonraki ilk birkaç haftalık dönemde arka bacaklarda ilerleyen parezis, paraliz, kaslarda aşırı gerginlik ve atrofi şekillenir. Bu tip hastalarda tipik olarak polyradiculoneuritis, polymyositis ve meningoencephalomyelitis görülür (Dumanlı ve Aktaş, 2015; Dubey ve ark., 2017).

Erişkin köpeklerde encephalitis, meningoencephalomyelitis ve myositis görülür. Parezis en yaygın nörolojik bulgudur ayrıca kasılma, anormal davranış, vestibuler disfonksiyon gibi semptomlar ortaya çıkar. Şekillenen myositis, tutuk yürüyüş, zayıflık, ağrı ve kas atrofilerine neden olur. Hastalığın seyri boyunca akciğer, karaciğer, göz ve kalp gibi organlar da tutulabilir. Bazı köpeklerde multifokal sistemik yayılma ve poligranülomatoz dermatitis tablosu da görülebilir (Dumanlı ve Aktaş, 2015; Dubey ve ark., 2017).

Yazışma adresi / Correspondence: Armağan Erdem Ütük, Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye E-posta: autuk@cu.edu.tr

ORCID IDs of the authors: 10000-0002-7986-3583 • 0000-0003-1074-652X

Sığırlarda en önemli semptom genellikle gebeliğin 5-6. aylarında görülen aborttur. Sığırlarda abort dışında fetal ölüm, resorbsiyon, mumifikasyon, otoliz, ölü doğum, klinik enfekte veya klinik açıdan normal fakat kronik enfekte yavrular doğabilir. İki ayıktan küçük buzağılarda, zayıflık, ayakta duramama, ön, arka veya her iki bacakta bükülme, aşırı gerilme, ataksi, pateller refleks azalması, bilinç kaybı, eksoftalmi ve gözlerde asimetri ara sıra hidrosephalus ve spinal kordda daralma gibi doğumsal anomaliler görülebilir (Trees et al., 1999; Dubey ve ark., 2017; Linsay ve Dubey, 2020).

Neospora caninum'un sığırlarda olduğu gibi mandalarda da abortlara neden olabileceği bildirilmiştir (Ütük ve ark., 2016). Etkenin keçilerde abort, ölü doğum ve fetal ölümlere neden olduğu bilinmesine rağmen koyun abortlarındaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Eşki ve ark., 2018; Utuk ve Eşki, 2019).

Hastalığın tanısında histopatolojik, moleküler (Polymerase Chain Reaction (PCR), Nested-PCR, Real Time PCR) ve serolojik yöntemler (c-ELISA, i-ELISA, Nükleik Asit Testleri (NAT) Immuno Fluorescence Antibody Test (IFAT)) kullanılmaktadır (Dubey ve ark., 2017; Linsay ve Dubey, 2020).

Bu çalışmanın amacı Osmaniye yöresindeki köpeklerin *N.caninum*'a maruziyet durumlarını c-ELISA yöntemi ile belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Osmaniye ilindeki, farklı ırklardan (Kangal, Akbaş, Malaklı, Alman Çoban Köpeği, Pointer, Melez) toplam 105 köpekten steril vakumlu tüplere kan örnekleri alınmış ve 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek serumların ayrılması sağlanmıştır. Protokol numaraları verilen serumlar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Ütük, 2018).

Köpekler ırk, yaş ve cinsiyetine göre gruplandırılmış (Tablo 1) ve gruplar ile seropozitiflik arasındaki ilişki ki-kare (χ^2) testi ile analiz edilmiştir.

Köpeklerin etkene maruziyetini belirlemek amacıyla serum örnekleri anti-*N.caninum* antikorlarına karşı c-ELISA (VMRD, USA) yöntemi ile incelenmiştir. Uygulama kit protokolüne uygun olarak yapılmış ve yüzde inhibisyon değerleri (%) hesaplanmıştır. % 1 değeri ≥ 30 olan örnekler pozitif, <30 olanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Utuk ve Eşki, 2017).

Bu çalışma için gerekli izinler Ceyhan Veteriner Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan alınmıştır (12.08.2020 tarih ve 05/03 no'lu karar).

Tablo 1. Seroprevalansın cinsiyet, yaş ve ırk gruplarına göre dağılımı

Değişkenler	Köpek sayısı (n)	Seropozitif köpek sayısı (n)	%
Cinsiyet	Erkek	26	36,61
	Dişi	11	32,35
	<1	7	23,33
Yaş grupları	1-3	16	39,02
	≥ 3	14	41,17
	Saf	18	34,61
İrk	Melez	19	35,84
	Toplam	37	35,23

Bulgular

Çalışma sonucunda ortalama prevalans %35,23 (37/105) olarak belirlenirken erkeklerin %36,61 (26/71)'inde, dişilerin ise %32,35 (11/34)'inde anti-*N.caninum* antikorları tespit edilmiştir.

Yapılan Ki-Kare (χ^2) testi sonucunda cinsiyet, yaş ve ırk ile seroprevalans arasındaki ilişkinin önemsiz ($p>0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Neospora caninum'un sığırcılık işletmelerinde neden olduğu yıllık ekonomik kaybın dünya genelinde 1,298 milyar dolar, Türkiye'de ise 40,5 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Demir ve ark., 2020).

Neosporosis'in ülkemizdeki ortalama yaygınlığının sığırlarda %14,7 ve keçilerde %14,44 olduğu belirtilmiştir (Eski ve Ütük, 2018; Ütük ve Eski, 2019). Hastalığın ülkemiz koyunlardaki yaygınlığı ise %0-2,7 arasında değişmektedir (Eşki ve ark., 2018).

Köpeklerde *N.caninum* seroprevalansını belirlemek amacıyla dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, IFAT, ELISA, c-ELISA, NAT gibi serolojik yöntemler kullanılmış ve prevalansın %0-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (Dubey ve ark., 2017).

Ülkemizde ise köpek neosporosisinin seroprevalansını belirlemeye yönelik çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda IFAT tekniği kullanılmış ve seroprevalansın Bursa'da %6,6 (7/106), Adana'da %18,2 (8/44) (Coşkun ve ark., 2013), Kırıkkale'de %28,9 (35/21) (Yıldız ve ark., 2009), Aydın'da %45 (54/120) (Ocaklı, 2011) ve Kars'ta ise %25,2 (53/210) (Mor ve Akça, 2012) olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada uygulama ve değerlendirme kolaylığı nedeni ile c-ELISA yöntemi tercih edilmiş ve Osmaniye yöresindeki köpeklerde seroprevalans %35,23 (37/105) olarak belirlenmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ırk, yaş ve cinsiyet ile seroprevalans arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda yaş ile seroprevalans (Ocaklı, 2011), bazılarında cinsiyet ile seroprevalans (Yıldız ve ark., 2009), bazılarında ise yaş, cinsiyet ve ırk ile seroprevalans (Çoşkun ve ark., 2013) arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu çalışmada ise yaş, cinsiyet ve ırk ile seroprevalans arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde değişkenler ve prevalans arasındaki ilişki konusundaki çelişkili sonuçların her çalışmadaki yaş gruplarının, örnek büyüklüklerinin ve örnekleme prosedürlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Adana yöresindeki neosporosis seroprevalansının sığırlarda %10,7 (24/225) (Eşki ve Eski ve Ütük, 2018) koyunlarda %12,4 (29/234) (Eşki ve ark., 2018), keçilerde %8,9 (34/383) (Ütük ve Eski, 2019) ve köpeklerde %18,2 (8/44) (Çoşkun ve ark., 2013), Bursa'da sığırlarda %19,23 (20/104) (Eşki ve ark., 2016), köpeklerde %6,6 (7/106) (Çoşkun ve ark., 2013), Kırıkkale'de sığırlarda %32,72 (142/434) (Vural ve ark., 2006), köpeklerde %28,9 (35/21) (Yıldız ve ark., 2009), Kars'ta sığırlarda %5,59 (17/304) köpeklerde %25,2 (53/210) (Mor ve Akça, 2012), Osmaniye'de keçilerde %1,19 (3/154) (Eşki, 2019) ve bu çalışmada ise köpeklerde %35,23 (37/105) olarak belirlenmiştir.

Son konak ve ara konakların birlikte incelendiği bölgelerde prevalanslar arasındaki tutarsızlıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların, köpek dışındaki ookistlerin bölgelerin farklı iklimatik koşullardan farklı düzeyde etkilenebileceği, her seropozitif köpeğin dışkısında ookistlerin bulunamayacağı, hastalığın ara konaklar arasındaki yayılmasında horizontal bulaşma dışında vertikal bulaşmanın da etkili olabileceği gibi sebeplerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışma ile ilk defa Osmaniye yöresindeki köpeklerin *N.caninum*'a maruziyet durumları hakkında bilgi verilmiştir. Ülkemizde neosporosisin başta sığırlar olmak üzere ara konaklardaki yaygınlığı hakkında çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen domestik sıklustaki en önemli konağı olan köpeklerdeki durumu hakkındaki çalışmaların yetersiz olduğu, hastalığın bulaşma dinamiklerinin daha iyi anlaşılabilmesi, daha etkin korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için gerek domestik gerekse silvistik sıklustaki ara ve son konaklar üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Teşekkürler: Saha çalışmalarında verdikleri desteklerden dolayı Osmaniye Belediyesi'ne teşekkür ederiz.

Maddi destek ve Çıkar ilişkisi: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- Çoşkun SZ, Aydın L, Bauer C. (2000) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. *Vet Record*. 146, 649.
- Demir PA, Eşki F, Ütük AE. (2020). Estimating the total economic costs of *Neospora caninum* infections in dairy cows in Turkey. *Trop Anim Health Prod*. 52, 1-8. DOI:10.1007/s11250-020-02351
- Dubey JP, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G. (2017) *Neosporosis in animals*. 1 st ed. London: Boca Raton (FL): CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN: 9781498752541.
- Dumanlı N, Aktaş M. (2015) Toxoplasmatidae (Toxoplasma, Neospora). Dumanlı N, Karaer Z, editör. *Veteriner Protozooloji*. 2. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi. ISBN: 9789757774792.
- Eşki F, Demir P, Babür C, Ütük AE. (2018) Türkiye'nin Adana yöresindeki koyunlarda *Toxoplasma gondii* ve *Neospora caninum* seroprevalansının araştırılması. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*. 29(1), 19-23.
- Eşki F, Önat K, Günaydın E, Pekaya S, Çetin N, Ütük AE. (2016). Detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydomydia abortus* and *Coxiella burnetii* antibodies in Aborted Holstein Cows. Proceedings of the 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress, Adana, Turkey.
- Eşki F, Ütük AE. (2018) Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle in Adana province of Turkey. *Van Vet J*. 29(2), 93-99.
- Eşki F. (2019) Investigation of Anti-*Neospora caninum* antibodies in hair goats in Osmaniye province. International VETEXPO-2019 Veterinary Sciences Congress September 20-22. Double Tree by Hilton Hotel, Avcılar /Istanbul, Turkey. P.121
- Lindsay DS, Dubey JP. (2020) Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in ruminants: An Update. *Vet Clin Food Anim*. 36, 205-222. DOI:10.1016/j.cvfa.2019.11.004.
- Mor N, Akça A, Kars yöresinde sığır ve köpeklerde *Neospora caninum* üzerine epidemiyolojik araştırmalar: gruplararası çalışma. (2012) *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 18 (Suppl-A), A193-A199. DOI:10.9775/kvfd.2012.6181
- Ocaklı S. (2011). Aydın ilindeki köpeklerde *Neospora caninum* enfeksiyonunun araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın.
- Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. (2013) What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle-the billion-dollar question. *Int J Parasitol*. 43, 133-142. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022.
- Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM. (1999) Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol*, 29, 1195-200. DOI: 10.1016/s0020-7519(99)00093-4.
- Ütük AE, Yılmaz O, Balkaya İ. (2016) Detection of Anti-*Neospora caninum* antibodies in Anatolian Water Buffalos from Afyonkarahisar province of Turkey, International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16), March 19-20, Kilis, Turkey.

- Utuk AE, Eski F. (2017) Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in a goat flock in Kilis province of Turkey. *Inter J Vet Sci.* 6(2), 114-117.
- Utuk AE, Eski F. (2019) Investigation of anti-*Neospora caninum* antibodies and disease-related risk factors in goats. *Med Weter.* 75(11), 678-683. DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6289](https://doi.org/10.21521/mw.6289).
- Ütük AE. (2018) Protozoal hastalıkların laboratuvar tansı, *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Intern Med-Special Topics.* 4(1), 17-22.
- Vural G, Aksoy E, Bozkır M, Kuçukayan U, Ertürk A. (2006) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle herds in Central Anatolia, Turkey. *Veterinarski Arhiv.* 76, 343-349.
- Yıldız K, Yasa Duru S, Yagcı BB, Babur C, Ocal N, Gurcan S, Karaca S. (2009) Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. *Türkiye Parazitolo Derg.* 33, 116-119.



Ankara Keçisinde (*Capra hircus*) dil papillalarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik yapısı üzerine incelemeler: I. Tat papillaları*

Burhan Toprak^{1*}, Selami Candan², Nurcan Özyurt Koçakoğlu³

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

^{2,3} Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 05.10.2020, Kabul tarihi / Accepted: 05.11.2020

Özet: Bu çalışmada Ankara keçisi dilindeki tat papillalarının yapısı ışık (IM) ve taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelendi. Çalışmada dört adet erişkin dişi Ankara keçisi dilleri kullanıldı. Işık ve taramalı elektron mikroskobu için dil örnekleri, dilin üst yüzünün apex, corpus, radix ve torus lingua bölgeleri ile dil ucunun alt yüzünden alındı. Ankara keçisi dilinde papilla fungiformis ve papilla vallata olmak üzere iki tip tat papillası gözlemlendi. Papilla fungiformis'ler, dil ucunun altı, dilin uç ve gövde kısmının üst yüzü ile yanlarında ve torus lingua'nın her iki yan tarafında tespit edildi. Bu papillalar, yuvarlak ve mantar şeklinde olup morfolojileri bulundukları yerlere göre farklılık göstermekteydi. SEM incelemelerinde, papilla fungiformis'lerin üst yüzeyinde tat porusları görüldü. Işık mikroskobu kesitlerinde bu papillaların tepesindeki epitel tabakada tat tomurcukları mevcuttu. Papilla vallatalar, dilin torus lingua bölgesinin her iki arka yan kısmında gözlemlendi. Bu papillaların etrafı belirgin bir hendeğe çevriliydi ve annüler pedler mevcuttu. SEM incelemelerinde, papillaların yüzeyi düzdü ve yüzeye açılan tat porusları mevcut değildi. IM incelemesinde, papilla vallata tat tomurcuklarının papillanın hendeğe bakan duvarında intraepiteliyal olarak bulundukları gözlemlendi. Ankara keçisi dilindeki tat papillalarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik yapısı incelenerek diğer ruminant türleriyle olan benzerlikleri ve farklılıkları belirlendi.

Anahtar kelimeler: Ankara keçisi, ışık mikroskop, taramalı elektron mikroskop, tat papillaları, tat tomurcuğu

Investigations on the light and scanning electron microscopic structure of the lingual papillae in the Angora Goat (*Capra hircus*): I. Gustatory papillae

Abstract: In this study, the structure of the gustatory papillae on tongue in the Ankara goat was examined by light (LM) and scanning electron microscope (SEM). In the study, tongues of four adult female Angora goats were used. For Light and Scanning Electron Microscope, lingual samples were taken from the apex, corpus, radix and torus regions of the dorsal lingual surfaces with ventral surface of tongue tip. Two types of gustatory papillae as fungiform and vallate papillae were observed on the tongue of the Angora goat. The fungiform papillae were detected on the ventral surface of tongue tip, dorsal and lateral parts of the lingual apex and body with both sides of the torus lingua. These papillae were round and mushroom like shape and their morphology displayed variety according to their location. In the SEM investigations, on the dorsal surface of fungiform papillae were observed taste pores. In LM examinations, taste buds were found in the epithelium of the dorsal parts of these papillae. The vallate papillae were observed on both caudo-lateral sides of the torus lingua. These papillae were encircled with a prominent papillary groove and there were annular pads. In SEM examinations, the surfaces of these papillae were flat and the taste pores opened to the surface were absent. In LM examinations, taste buds of vallate papillae were observed in the epithelium of the inner trench walls of the papillae. As a result, the light and scanning electron microscopic structure of the gustatory papillae on the tongue of Angora goat were examined and their similarities and differences with other ruminant species were determined.

Keywords: Angora goat, gustatory papillae, light microscopy, scanning electron microscopy, taste bud

Giriş

Dil, beslenme ağız boşluğundaki diğer organlarla birlikte önemli bir rol oynar. Dilin memelilerdeki morfolojik ve histolojik özellikleri, canlılardaki beslenme tarzları arasındaki farklılıkların bir yansımasıdır (Iwasaki 2002). Memeli hayvanlarda dil üzerinde

mekanik etkili ve tat duyusunu alan dil papillaları vardır. Mekanik etkili papillalar yiyeceklerin alınması, parçalanması ve yutulmasında görev alırlar. Tat duyusunu alan papillalar ise tatlı, acı, ekşi, tuzlu v.b. tatların alınmasını sağlayarak besin seçiminde rol oynamaktadırlar.

* Bu çalışma "Light and Scanning Electron Microscopic Structure of Gustatory Papillae on Tongue in the Angora Goat (*Capra hircus*)" başlıkla I. Uluslararası Türkiye Veteriner Anatomi Kongresi. X. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi. 13-16 Eylül 2017, Sandıklı/Afyonkarahisar kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi / Correspondence: Burhan Toprak, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Genetik Laboratuvarı, Keçiören-Ankara E-Posta: burhan.toprak@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-1082-4559 • ²0000-0002-7402-1360 • ³0000-0001-7137-8631

Şimdiye kadar birçok hayvan türünde dildeki papillaların tipleri, dağılımları, ışık mikroskopik yapısı, SEM ve TEM özelliklerini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Çift tırnaklı hayvanların değişik tür ve ırklarında dildeki hem tat hem de mekanik etkili papillaların ışık ve taramalı elektron mikroskopik yapıları incelenmiştir. Buna göre Jamunapari keçisi (Kumar ve ark. 1998), formason keçi antilobu (Atoji ve ark. 1998; Takayuki ve ark. 2002), kara antilobu (Emura ve ark. 1999), berberi koyunu (Emura ve ark. 2000), bighorn koyunu (Takayuki ve ark. 2002), mehraban kuzusu (Tadjalli ve Pazhoomand 2004), Saanen keçisi (Kurtul ve Atalgın 2008) ve Markhoz keçisi (Goodarzi ve Hoseini 2015) gibi evcil ve yabani çift tırnaklı hayvanlarda dil papillalarının taramalı elektron mikroskopik yapıları incelenmiştir.

Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Akkaraman koyunu (Harem ve ark. 2009), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010), keçi (Fonseca ve ark. 2011), gazel (Kocak Harem ve ark. 2011), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve sığır-yakda (Yanping ve ark. 2016) dil papillalarının hem ışık hem de taramalı elektron mikroskopik yapıları ortaya konulmuştur.

Bir step hayvanı olan Ankara keçisi (*Capra hircus*), 800 metreden daha yukarı rakımlarda, kuru ve az yağışlı iklim tipine sahip Orta Anadolu'da yetişir. Bu hayvanlar, alçak arazide ve rutubetli ortamlarda yaşayamazlar. Ankara ilinin Ayaş, Beypazarı ve Gündül ilçeleri başta olmak üzere, İç Anadolu bölgesi ile Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgesinin bazı illerinde yetiştirilmektedirler. Başta tiftik olmak üzere et ve deri ticareti için yetiştirilir. Dünyanın en kaliteli tiftikleri, Ankara'da yetiştirilen keçilerden elde edilmektedir. Bölgenin iklim şartları, bitki örtüsü ve keçinin beslenme şekli tiftiğin kalitesinde etkili olmaktadır.

Ankara keçisi, bozkır ortamına mükemmel bir şekilde uyum sağlamıştır. Kapalı ve ağır ortamında uzun süre kalamazlar. En ağır kış şartlarında bile meradan azami oranda yararlanırlar. Oldukça hareketli olan Ankara keçileri, uçtan ve taze otlarla beslenirler. Bunların yanı sıra çalı, diken ve ağaç yapraklarını da severek tüketirler.

Sunulan bu çalışma, Ankara keçisinin dilinde bulunan tat papillalarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik yapılarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Ankara'nın Gündül ilçesinden sağlanan kasaplık dört adet erişkin dişi Ankara keçisi materyal

olarak kullanıldı. Yerel bir mezbahada kesim yapıldıktan hemen sonra taze olarak alınan diller, serum fizyolojik ile yıkandı. Işık ve taramalı elektron mikroskopu için dil örnekleri, dilin üst yüzünün apex, corpus, radix ve torus lingua bölgeleri ile dil ucunun alt yüzünden alındı.

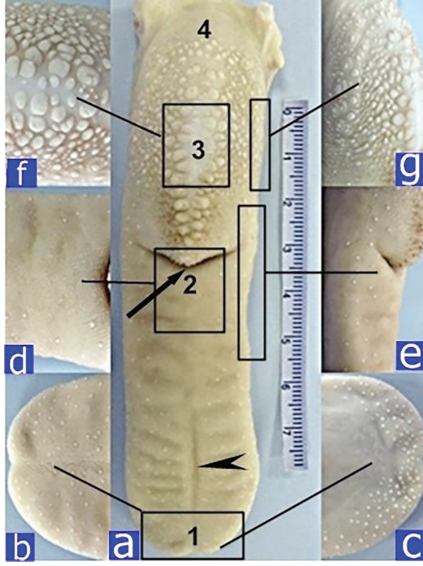
Taramalı elektron mikroskopik incelemeler için dil örnekleri, %10'luk formaldehit'te tespit edildi. Daha sonra FAA'de (%10 Formaldehit-%5 Asetik Asit-%85 Alkol) ikinci tespit yapıldı. Bu tespit sonrası çok kısa bir sürede normal hava şartlarında kurutma gerçekleştirildi. Kurutulan dil örnekleri SEM incelemesi için stublara yerleştirildi. Bu örneklerin altınla kaplanması sonrası 5-10 kV aralığında JEOL JSM 6060 LV taramalı elektron mikroskopunda inceleme yapılarak fotoğraflandı.

Işık mikroskopik incelemeler için dil örnekleri, %10'luk formaldehitte tespit edildi. Daha sonra dokulardan yıkama, dehidrasyon, parafine doyurma ve gömme işlemleri yapıldı. Elde edilen parafin bloklardan 6 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan bu kesitler, Mallory'nin üçlü boyası ve H&E boyası ile boyandı. Bu kesitler, Olympus CX21 ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğraflandı.

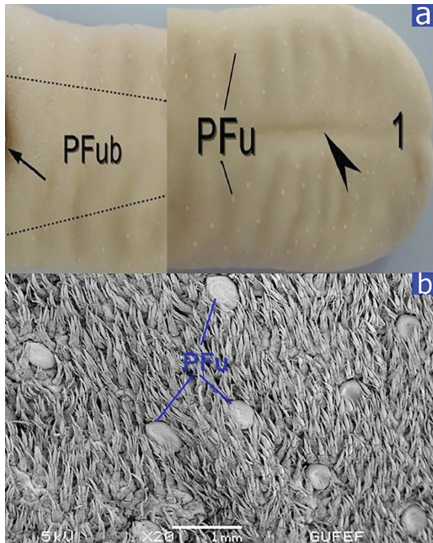
Bulgular

Ankara keçisi dili ortalama olarak 12 cm uzunluğundaydı. Dil üzerinde apex, corpus ve radix lingua olmak üzere üç kısım ayırt edildi. Dilin apex lingua'sı üzerinde düzensiz bir sulcus medianus gözlemlendi. Dildeki corpus lingua üzerinde oldukça iyi gelişmiş bir torus lingua ve bunun ön kısmında belirgin bir fossa lingua tespit edildi (Şekil 1a). Dil üzerinde papilla filiformis, papilla conica ve papilla lentiformis olmak üzere 3 tip mekanik papilla ile papilla fungiformis ve papilla vallata olmak üzere iki tip tat papillası görüldü (Şekil 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g).

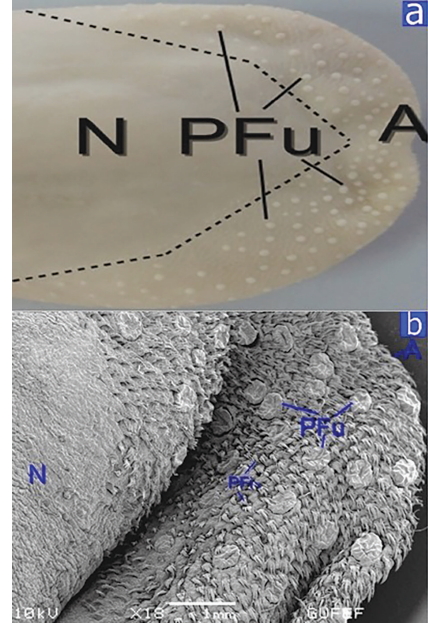
Papilla fungiformis'lerin, papilla filiformis'ler arasında dağılmış halde dilin üst yüzünde, dil ucunun altında, dil gövdesi boyunca yanlarda ve torus lingua'nın yanlarında yer aldıkları görüldü. Bunlar dil ucunun üstünde (Şekil 2a) ve altında (Şekil 3a) yoğun olarak bulunmaktaydılar. Dil gövdesinin yanlarında ve torus lingua bölgesinde yer alanların sayısı daha azdı (Şekil 4a). Dilin üst kısmında sulcus medianus'un sonlandığı yerden fossa lingua'ya kadar olan median hatta papilla fungiformis'ler görülmedi (Şekil 2a, Şekil 4a). Dil ucunun üst ve altındaki papilla fungiformis'lerin dil gövdesinin yanları ve torus lingua'da yer alanlardan daha küçük oldukları tespit edildi.



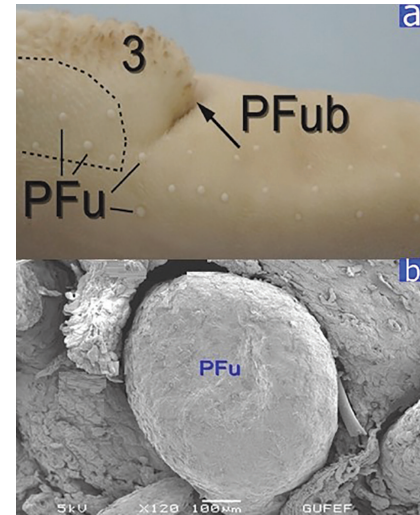
Şekil 1-a) Dilin üst yüzeyinin makroskobik genel görünümü. **1:** Apex lingua, **2:** Corpus lingua, **3:** Torus lingua, **4:** Radix lingua, **Ok başı:** Sulcus medianus, **ok:** Fossa lingua. **b)** Dil ucunun üst yüzeyindeki papilla fungiformis'ler, **c)** dil ucunun alt yüzündeki papilla fungiformis'ler, **d)** dil gövdesindeki papilla fungiformis'ler, **e)** torus lingua'nın yanındaki papilla fungiformis'ler, **f)** torus lingua'daki papilla lentiformis ve papilla conica'lar, **g)** Papilla vallata'ların görünümü.



Şekil 2-a) Dil ucunun üst yüzeyindeki ve dil gövdesinin yanlarındaki papilla fungiformis'ler. **1:** Dil üst ucu, **Ok başı:** Sulcus medianus, **PFu:** Papilla fungiformis'ler, **PFub:** Papilla fungiformis'lerin olmadığı bölge, **Ok:** fossa lingua. **b)** Dil ucunun üst yüzündeki papilla fungiformis'lerin taramalı elektron mikroskopta düşük büyültmede görünümü. **PFu:** Papilla fungiformis'ler.

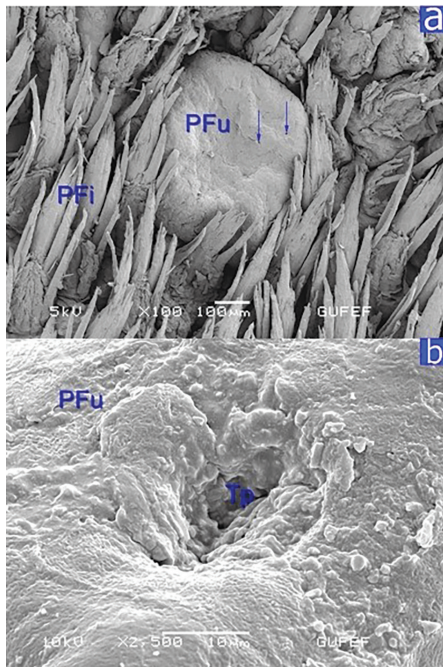


Şekil 3-a) Dil ucunun alt yüzündeki papilla fungiformis'ler **A:** Dil alt ucu, **PFu:** Papilla fungiformis'ler, **N:** Dil ucu altında herhangi bir papillanın bulunmadığı bölge. **b)** Dil ucunun altındaki papilla fungiformis'lerin taramalı elektron mikroskopta düşük büyültmede görünümü. **A:** Dil ucu, **N:** Dil ucunun altında herhangi bir papillanın bulunmadığı bölge, **PFu:** Papilla fungiformis'ler, **PFi:** Papilla filiformis'ler.

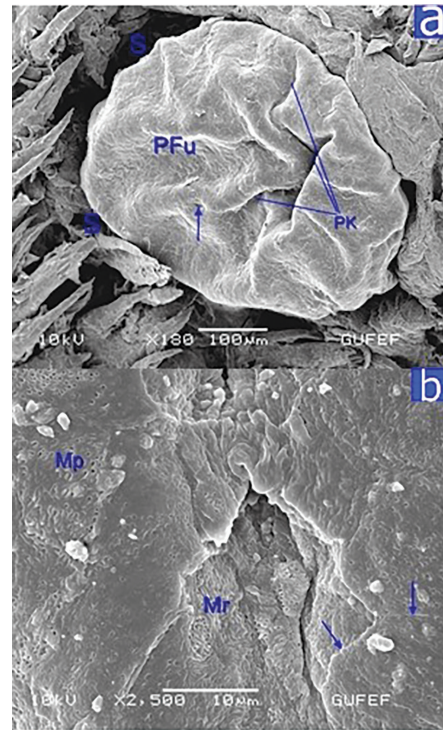


Şekil 4-a) Torus lingua'nın yanındaki papilla fungiformis'ler. **PFu:** Papilla fungiformis'ler, **PFub:** Papilla fungiformis'lerin bulunmadığı bölge. **3:** Torus lingua, **ok:** Fossa lingua. **b)** Dilin torus lingua bölgesinde yer alan bir papilla fungiformis'in taramalı elektron mikroskopik görünümü. **PFu:** Papilla fungiformis.

Taramalı elektron mikroskopik incelemede, papilla fungiformis'lerde dilde bulundukları yerlere göre morfolojik olarak farklılıklar görüldü. Eliptik veya yuvarlak şekilli mantara benzeyen bu papillalar, belirgin bir sulcus ile papilla filiformisler'den ayrılmaktaydı. Dil ucunun üstünde yer alan papilla fungiformis'ler, daha düzgün bir yüzeye sahip olmasına rağmen, bazılarında çukurluklar görüldü (Şekil 2b ve Şekil 5a). Bu bölgedeki papillaların ortalama çapları 360-484 μm arasında değişmekteydi. Dil ucunun altındaki papilla fungiformis'lerin yüzeyleri dalgalı ve buruşuk bir bezelye görünümündeydi (Şekil 3b ve Şekil 6a). Burada yer alan papilla fungiformis'lerin çapları 352-489 μm arasında değişmekteydi. Dil gövdesinin yanlarında ve torus lingua'nın yan kısımlarında daha seyrek olarak bulunan papilla fungiformis'ler, daha büyük ve düzgün bir yüzeye sahiptiler (Şekil 4b). Buradaki papillaların çapı 642-653 μm arasında değişmekteydi. Her üç bölgede de papillaların yüzeyinde ağız boşluğuna açılan tat porusları gözlemlendi. Papilla fungiformis'ler yüzeyinden yapılan yüksek büyültmelerde yüzey epitel hücrelerinin sınırları belirgindi. Epitel hücreler yüzeyinde micropit'ler ve microridge'ler tespit edildi. (Şekil 5b ve şekil 6b).



Şekil 5-a) Dil ucunun üst yüzünde yer alan bir papilla fungiformis'in taramalı elektron mikroskopta görünümü. **PFu:** Papilla fungiformis, **PFi:** Papilla filiformis'ler, **Oklar:** Tat porusları **b)** Bir papilla fungiformis tat porusunun taramalı elektron mikroskopta yüksek büyültmede görünümü. **PFu:** Papilla fungiformis, **Tp:** Tat porusu.



Şekil 6-a) Dil ucunun altındaki bir papilla fungiformis'in taramalı elektron mikroskopik görünümü. **PFu:** Papilla fungiformis'ler, **S:** Papilla fungiformis'leri etrafındaki papilla filiformis'lerden ayıran papilla yarığı, **PK:** Papilla yüzeyindeki yüzey kıvrımları, **Ok:** Tat porusu. **b)** Dil ucunun altındaki bir papilla fungiformis ve papillaya ait bir tat porusunun taramalı elektron mikroskopta yüksek büyültmede görünümü. **Mp:** Papilla yüzey epitelindeki çukurlar, **Mr:** Papilla yüzey epitelindeki çıkıntılar, **Oklar:** Yüzey epiteli hücre sınırları.

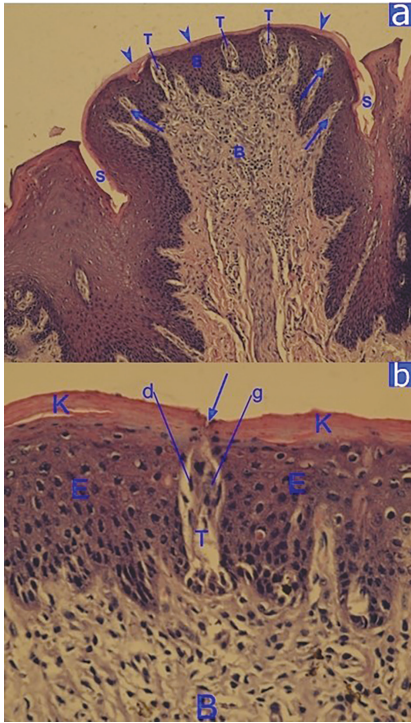
Işık mikroskopik incelemede, papilla fungiformis'ler çok katlı yassı bir epitel ile örtülüydü ve epitel yüzeyinde zayıf bir keratinizasyon mevcuttu. Bu papillaları, papilla filiformis'lerden ayıran papilla yarığı oldukça belirgindi. Bağ dokunun yapmış olduğu mikroskobik papillalar görüldü. Üç bölgede de bu papillaların tepesinde epitel tabakaya gömülü tat tomurcukları tespit edildi (Şekil 7a). Bu tat tomurcukları, tat poruslarıyla ağız boşluğuna açılmaktaydı. Tat tomurcuklarında açık boyalı ve koyu boyalı iki tip tat tomurcuğu hücresi gözlemlendi (Şekil 7b).

Yuvarlak veya oval şekilli irili ufaklı papilla valla-ta'lar, dilin torus lingua'sının postero-lateral'inde iki sıra halinde gözlendi. Bu papillaların sayısı toplamda 26-32 arasında değişmekteydi (Şekil 8a).

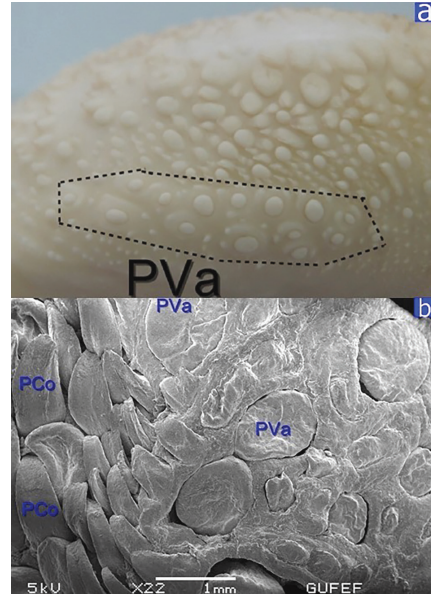
Taramalı elektron mikroskopik incelemede, papilla vallata'ların en küçüklerinin çapı 487-591 μm , en büyüklerinin çapı ise 838 μm -1.47 mm arasında

değişmekteydi (Şekil 8b). Papillalar derin bir hendekle çevriliydi. Bu papilla hendeklerinin bir annüler ped ile çevrili oldukları tespit edildi (Şekil 9a). Papilla yüzeylerinden yapılan yüksek büyültmelerde oldukça düzgün bir yüzeye sahip oldukları görüldü. Papilla vallata'ların üst yüzünde tat porusları görülmedi. Yüksek büyültmelerde yüzey epiteline micro-pit ve microridge'ler tespit edildi (Şekil 9b).

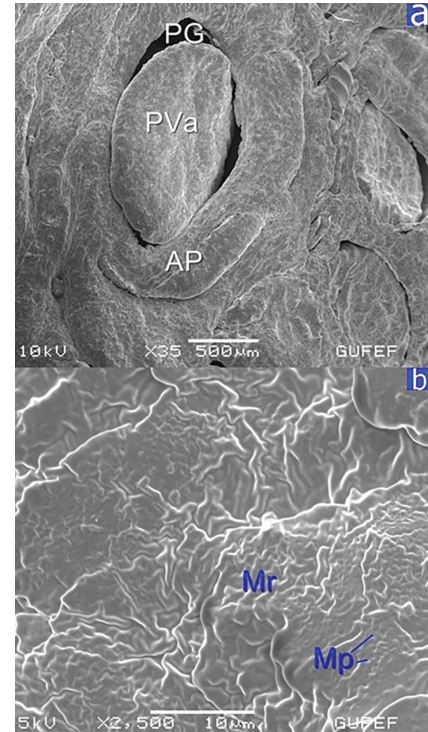
Işık mikroskopik incelemede papilla vallata'lar, çok katlı yassı bir epitel tabaka ile örtülüydü. Papilla yüzeylerinde zayıf bir keratin tabaka gözlemlendi. Bağ dokunun papilla yüzey epiteline doğru mikroskopik papillalar yaptığı görüldü. Tükürük bezlerinin akıtıcı kanallarının papilla hendeklerinin kaidesine açıldıkları gözlemlendi. Tat tomurcukları, papillaların hendeğe bakan medial duvarlarında intraepitelial olarak tespit edildi. (Şekil 10a). Papilla vallata tat tomurcuklarının tat poruslarıyla papilla hendeklerine açıldıkları görüldü. Tat tomurcuklarında açık ve koyu boyalı tat tomurcuğu hücreleri tespit edildi (Şekil 10b)



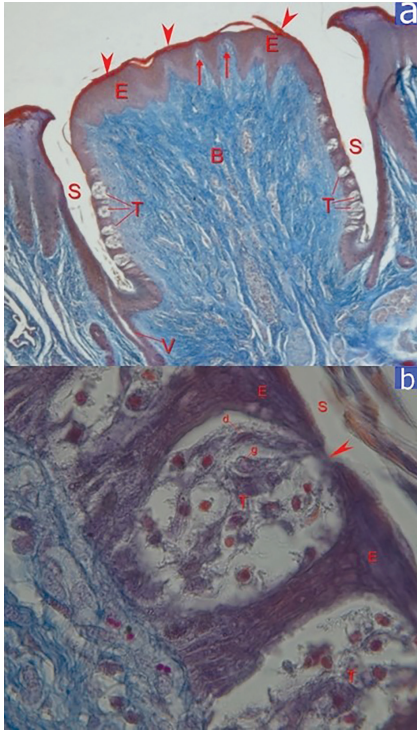
Şekil 7-a) Dil ucundaki papilla fungiformis'lerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E). **E:** Çok katlı yassı epitel, **B:** bağ doku, **T:** tat tomurcukları, **S:** papilla yarığı, **ok başları:** keratinize tabaka, **oklar:** bağ dokunun epitele doğru yapmış olduğu mikroskopik papillalar. **b)** Papilla fungiformis'te bir tat tomurcuğunun ışık mikroskopik görünümü (H&E). **E:** Epitel tabaka, **B:** Bağ doku, **T:** tat tomurcuğu **K:** Keratinize tabaka, **d:** koyu boyalı tat tomurcuğu hücresi **g:** açık boyalı tat tomurcuğu hücresi, **Ok:** Tat porusu.



Şekil 8-a) Papilla vallata'ların makroskopik görünümü. **PVa:** papilla vallata'lar. **b)** Papilla vallata'ların taramalı elektron mikroskopik görünümü. **PVa:** Papilla vallata'lar, **PCo:** Papilla conica'lar.



Şekil 9-a) Bir papilla vallata'nın taramalı elektron mikroskopik görünümü. **PVa:** Papilla vallata, **PG:** Papilla vallata hendeği, **AP:** Annuler ped. **b)** Bir papilla vallata'nın taramalı elektron mikroskopta yüksek büyültmede görünümü. **Mp:** Papilla yüzey epitelindeki çukurlar, **Mr:** Papilla yüzey epitelindeki çıkıntılar.



Şekil 10-a) Papilla vallata'nın ışık mikroskopik görünümü: **E:** Çok katlı yassı epitel, **B:** Bağ doku, **S:** Papilla hendeği, **T:** Tat tomurcukları, **V:** Von Ebner bezinin akırtıcı kanalı, **Ok başları:** Keratinize tabaka, **Oklar:** Mikroskopik papillalar. Mallory'nin Üçlü boyaması. **b)** Papilla vallata'daki bir tat tomurcuğunun ışık mikroskopik görünümü. **E:** Çok katlı yassı epitel, **T:** Tat tomurcukları, **S:** Papilla hendeği, **d:** koyu boyalı tat tomurcuğu hücresi, **g:** açık boyalı tat tomurcuğu hücresi, **ok başı:** papilla hendeğine açılan tat porusu. Mallory'nin üçlü boyaması.

Tartışma ve Sonuç

Çift tırnaklılardan (*Artiodactyla*) inek (Chamorro ve ark. 1986) ve bilinen en küçük çift tırnaklı olan cüce geyikte (Agungpriyono ve ark. 1995) papilla fungiformis, papilla vallata ve papilla foliata olmak üzere 3 tip tat papillası, su aygırında ise (Yoshimura ve ark. 2009) papilla fungiformis ve papilla foliata olmak üzere iki tip tat papillası bulunduğu bildiriminin aksine Ankara keçisi dilinde papilla fungiformis ve papilla vallata olmak üzere iki tip tat papillası tespit edilmiştir.

Ankara keçisinde papilla fungiformis'ler, Japon keçi antilobu (Funato ve ark. 1985; Takayuki ve ark. 2002), Çin munçağı (Zheng ve Kobayashi 2006), Akkaraman koyunu (Harem ve ark. 2009), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010), gazel (Kocak Harem ve ark. 2011) ve alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk

ve ark. 2015) benzer şekilde küçük ve büyük olmak üzere iki tipti ve bunlardan dil ucunun üst ve altındaki papilla fungiformis'lerin dil gövdesinin yanları ve torus lingua'da yer alanlardan daha küçük oldukları tespit edildi. Ancak bu bulguların aksine Agungpriyono ve ark. (1995) cüce geyikte papilla fungiformis'lerin dilin ucunda yoğun ve daha büyük olduğunu, Yanping ve ark. (2016) sığır-yakda papilla fungiformis'lerin sayısının dil gövdesinden dil ucuna doğru kademeli olarak azaldıklarını bildirmişlerdir.

Evcil ve yabani bazı ruminantlarda (Atoji ve ark. 1998; Kumar ve ark. 1998; Tadjalli ve Pazhoomand 2004; Zheng ve Kobayashi 2006; Kurtul ve Atalgın 2008; Goodarzi ve Hoseini 2015) ve tek hörgüçlü develerde (Qayyum ve ark. 1988) papilla fungiformis'lerin kendilerini papilla filiformis'lerden ayıran derin bir sulcus'a sahip olduğu bildirimleri bu çalışmada tespit edilmiştir. Ancak gazel (Kocak Harem ve ark. 2011) ve pampa geyiği (Erdoğan ve Perez 2013) papilla fungiformis'lerinde bu sulcus'un bulunmadığı bildirilmiştir.

Ankara keçisine benzer şekilde inek (Chamorro ve ark. 1986), cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), pampa geyiği (Erdoğan ve Perez 2013), Markhoz keçisi (Goodarzi ve Hoseini 2015), Anadolu mandası (Can ve Atalgın 2015), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve Karacabey merinosunda (Can ve ark. 2016) papilla fungiformis'ler yüzeyinde tat poruslarının bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışma bulgularının aksine Jamunapari keçisi (Kumar ve ark. 1998), Saanen keçisi (Kurtul ve Atalgın 2008) ve Akkaraman koyununda (Harem ve ark. 2009) papilla fungiformis'ler yüzeyinde tat porusu bulunmadığı bildirilmiştir.

Jamunapari keçisi (Kumar ve ark. 1998), pampa geyiği (Erdoğan ve Perez 2013), Anadolu mandası (Can ve Atalgın 2015), Markhoz keçisi (Goodarzi ve Hoseini 2015), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve Karacabey merinosunda (Can ve ark. 2016) papilla fungiformis'ler yüzeyinden yapılan yüksek büyültmede görülen yüzey epitel hücreler bu çalışmada da tespit edilmiştir. Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Jamunapari keçisi (Kumar ve ark. 1998), Anadolu mandası (Can ve Atalgın 2015) ve alpaka (Erdoğan ve ark. 2016) microridge'ler bulunduğu bildirimleri ile Karacabey merinosunda (Can ve ark. 2016) epitel hücre yüzeylerinde micropit'lerin bulunduğu bildirimi bu çalışma sonuçları ile uyumluydu.

Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995) ve Zavot ineğinde (Karadag Sarı ve ark. 2010) bildirilenlere benzer şekilde ışık mikroskopik incelemede,

papilla fungiformis'lerin çok katlı yassı bir epitel tabakaya sahip oldukları tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada papilla fungiformis'lerde görülen zayıf bir keratinizasyon bulgusu, cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Akkaraman koyunu (Harem ve ark. 2009), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve siğir-yakda (Yanping ve ark. 2016) bildirilenlere benzer olduğu saptandı.

Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. (2015) alpaka dilinde papilla fungiformis'lerin bağ dokusunun papiller yüzeyi sıklıkla penetre etmedikleri bildiriminin aksine mevcut çalışmada bağdokunun yüzeye yapmış oldukları mikroskopik papillalar tespit edilmiştir. Akkaraman koyununda (Harem ve ark. 2009) papilla fungiformis'lerde tat tomurcuklarının bulunmadığı bildirilmiştir. Gazel (Kocak Harem ve ark. 2011) ve koyunda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) dilin gövdesi ve üst yüzünde bulunan birinci tip ve küçük papilla fungiformis'lerde tat tomurcuklarının bulunduğunu ancak ikinci tip ve daha büyük olan torus lingua'da yer alan papillalarda tat tomurcuklarının yer almadığını bildirmişlerdir. Çalışmada üç bölgede de bu papillaların tepesinde epitel tabakaya gömülü tat tomurcukları tespit edildi ve bu tat tomurcukları, tat poruslarıyla ağız boşluğuna açılmaktaydı. Tabata ve ark. (2006) siğir papilla fungiformis tat tomurcuklarında tip 1 ve tip 2 tat hücreleri bulunduğu bildirmine benzer şekilde tat tomurcuklarında açık boyalı ve koyu boyalı iki tip tat tomurcuğu hücresi de gözlemlendi.

Bu çalışmada yuvarlak veya oval şekilli irili ufaklı papilla vallata'lar, dilin torus lingua'sının postero-lateral'inde iki sıra halinde gözlemlendi. Papilla vallata'ların sayısı toplamda 26-32 arasında değişmekteydi. Alpakada 6-8 adet (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015), alpakada 2-3 adet sol, 3-4 adet sağda, lamada 4 adet sağ, 3-4 adet solda (Erdoğan ve ark. 2016), pampa geyiğinde 10-18 adet (Erdoğan ve Perez 2013), Anadolu mandasında 23 adet (Can ve Atalgın 2015), gazel (Kocak Harem ve ark. 2011), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010) ve Saanen keçisinde (Kurtul ve Atalgın 2008) 26 adet, siğir-yakda 28 adet (Yanping ve ark. 2016), antilopta (Emura ve ark. 1999) ve berberi koyununda 30 adet (Emura ve ark. 2000), Akkaraman koyununda 36 adet (Harem ve ark. 2009) ve Karacabey merinosunda 38-52 adet (Can ve ark. 2016) papilla vallata bulunduğu bildirilmiştir. Ankara keçisindeki papilla vallata'ların sayısı gazel (Kocak Harem ve ark. 2011), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010) ve Saanen keçisi (Kurtul ve Atalgın 2008) papilla vallata sayıları ile benzerdi.

Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Jamunapari keçisi (Kumar ve ark. 1998), Saanen ke-

çisi (Kurtul ve Atalgın 2008), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010), gazel (Kocak Harem ve ark. 2011), Markhoz keçisi (Goodarzi ve Hoseini 2015), alpaka (Erdoğan ve ark. 2016; Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve Karacabey merinosunda (Can ve ark. 2016) bildirilenlere benzer şekilde Ankara keçisi papilla vallata'ları derin bir hendekle çevriliydi ve bu papilla hendekleri bir annular pedlere sahipti. Akkaraman koyununda (Harem ve ark. 2009) papilla vallata'ların tek tek veya bazen 2-3'lü gruplar halinde bir hendekle çevrili ve belirgin bir annular pede sahip olmadıkları, koyunlarda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) bazı papilla vallata'larda annular ped bulunmadığı bildirimleri çalışmamızda görülmemiştir.

Pampa geyiği (Erdoğan ve Perez 2013) ve guanakoda (Erdoğan ve ark. 2016) papilla vallata'ların düzgün bir yüzeye sahip olduğu bildirimleri sunulan çalışmada da tespit edilmiştir. Çalışma bulgularının aksine Kocak Harem ve ark. (2011) gazelde papilla vallata'ların düzensiz bir yüzeye sahip olduklarını, El Sharaby ve ark. (2012) tek hörgüçlü deve de papilla vallata'ların çevresinin düz, merkezinde ise dar hendekler olduğunu ve mikroplikasyonun bulunduğunu bildirmişlerdir.

Chamorro ve ark. (1986) inekte papilla vallata hendeği ve papilla yüzeyine açılan tat porusları bulunduğunu, Goodarzi ve Hoseini (2015) Markhoz keçisinde, Yanping ve ark. (2016) siğir-yakda ve Erdoğan ve Sağsöz (2018) koyunda papilla vallata yüzeyine açılan tat poruslarının bulunduğunu bildirmişlerdir. Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. (2015), alpakada papilla vallata'da bulunan psüdo papillalar yüzeyinde tat poruslarının bulunduğunu, El Sharaby ve ark. (2014) buffaloda papilla hendeklerine bitişik tat poruslarının yer aldığını, El Sharaby ve ark. (2012) tek hörgüçlü develerde genç ve yaşlılarda primer ve sekonder hendekler yakınında tat poruslarının yerleştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada papilla vallata yüzeylerinde tat porusu görülmemiştir.

Agungpriyono ve ark. (1995) cüce geyikte papilla vallata yüzey epitelinde mikroridge'ler bulunduğu bildirimine benzer şekilde yüksek büyütmelede papilla vallata yüzey epitelinde micropit ve microridge'ler tespit edildi.

Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010), tek hörgüçlü deve (El Sharaby ve ark. 2012), buffalo (El Sharaby ve ark. 2014) ve koyunda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) ışık mikroskopik incelemede papilla vallata'ların çok katlı yassı bir epitel tabakaya sahip olduğu bildirimleri çalışmamızda da gözlemlendi. Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Akkaraman koyunu (Harem ve ark.

2009), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve koyunda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) papilla vallata yüzeylerinde zayıf bir keratinizasyon olduğu bildirilmiştir. Kocak Harem ve ark. (2011), gazelde orta kalınlıkta bir keratin tabaka bulunduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Akkaraman koyunu (Harem ve ark. 2009), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve koyunda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) bildirilenlere benzer şekilde zayıf bir keratin tabaka gözlemlendi. Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), sığır (Tabata ve ark. 2003), Akkaraman koyunu (Harem ve ark. 2009), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010), gazel (Kocak Harem ve ark. 2011), tek hörgüçlü deve (El Sharaby ve ark. 2012), buffalo (El Sharaby ve ark. 2014), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve koyunda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) bildirilenlere benzer şekilde papilla vallata'daki tat tomurcukları, papillaların hendeğe bakan medial duvarlarında intraepitelial olarak tespit edildi ve bu tat tomurcukları tat poruslarıyla papilla hendeklerine açılmaktaydı. Tabata ve ark. (2003) sığırdaki tip 1 ve tip 2 olmak üzere papilla vallata tat tomurcuklarında iki tip tat tomurcuğu hücresi bulunduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada tat tomurcuklarında açık ve koyu boyalı olmak üzere iki tip tat tomurcuğu hücreleri tespit edilmiştir. Cüce geyik (Agungpriyono ve ark. 1995), Zavot ineği (Karadag Sarı ve ark. 2010), tek hörgüçlü deve (El Sharaby ve ark. 2012), alpaka (Gozdziewska-Harłajczuk ve ark. 2015) ve koyunda (Erdoğan ve Sağsöz 2018) tükürük bezlerinin akıtıcı kanallarının papilla vallata hendeklerinin kaidesine açıldıkları bildirimi çalışmamızda da tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Ankara keçisi dilindeki tat papillalarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik bulguları, diğer evcil ve yabani ruminant dilindeki tat papillalarından elde edilen bulgular ile karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda benzerlikler ve farklılıklar olduğu görülmüştür. Görülen bu farklılıkların Ankara keçisinin besin türü ve beslenme şekillerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin alanındaki bilgi birikimine katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Deney Hayvanları Kullanımı Etik Kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) bendi 2. maddesi gereği izin alınmamıştır.

Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi: Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur.

Yazarların Katkı Oranı: BT çalışmanın planlanması, materyal temini ve örneklerin hazırlanması, SC taramalı elektron mikroskop incelemesi, NÖK ışık mikroskop incelemesi, BT SEM ve ışık mikroskopik görüntülerin değerlendirilmesi ve makalenin yazımı.

Kaynaklar

- Agungpriyono S, Yamada J, Kitamura N, Nisa C, Sigit K, Yamamoto Y. (1995). Morphology of the dorsal lingual papillae in the lesser Mouse deer, *Tragulus javanicus*. *J Anat.* 187, 635-640.
- Atoji Y, Yamamoto Y, Suzuki Y. (1998). Morphology of the tongue of a male formosan serow (*Capricornis crispus swinhoei*). *Anat Histol Embryol.* 27, 17-19.
- Can M, Atalgın SH. (2015). Scanning electron microscopic study of the lingual papillae in the Anatolian water buffalo. *Int J Morphol.* 33, 855-859.
- Can M, Atalgın SH, Ateş S, Takçı L. (2016). Scanning electron microscopic study on the structure of the lingual papillae of the Karacabey Merino sheep. *Eurasian J Vet Sci.* 32, 130-135.
- Chamorro CA, de Paz P, Sandoval J, Fernandez JG. (1986). Comparative scanning electron microscopic study of the lingual papillae in two species of domestic mammals (*Equus caballus* and *Bos taurus*). I. Gustatory papillae. *Acta Anat.* 125, 83-87.
- El Sharaby AA, Alsafy MA, El-Gendy SA, Wakisaka S. (2012). Morphological characteristics of the vallate papillae of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Anat Histol Embryol.* 41, 402-409.
- El Sharaby AA, El-Gendy SA, Alsafy MA, Nomir AG, Wakisaka S. (2014). Morphological variations of the vallate papillae in some mammalian species. *Anat Sci Int.* 89, 161-170, DOI 10.1007/s12565-013-0215-9.
- Emura S, Tamada A, Hayakawa D, Chen H, Yano R, Shoumura S. (1999). Morphology of the dorsal lingual papillae in the blackbuck, (*Antelope Cervicapra*). *Okajimas Folia Anat Jpn.* 76, 247-254.
- Emura S, Tamada A, Hayakawa D, Chen H, Shoumura S. (2000). Morphology of the dorsal lingual papillae in the Barbary sheep. *Ammotragus lervia*. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 77, 39-46.
- Erdoğan S, Perez W. (2013). Anatomical and scanning electron microscopic studies of the tongue in the pampas deer (*Cervidae: Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). *Micro Res Tech.* 76, 1025-1034.
- Erdoğan S, Villar Arias S, Pérez W. (2016). Morphofunctional structure of the lingual papillae in three species of south american camelids: Alpaca, Guanaco, and Llama. *Microsc Res Tech.* 79, 61-71.
- Erdoğan S, Sağsöz H. (2018). Papillary architecture and functional characterization of mucosubstances in the sheep tongue. *Anat Rec.* 301, 1320-1335.
- Fonseca ET, Oliveira CM, Francioli ALR, Miglino MA. (2011). Characteristics of dorsal lingual papillae of the goat (*Capra hircus*): Light and scanning electron microscopy study. *Pesq Vet Bras.* 31, 67-73.
- Funato H, Atoji Y, Suzuki Y, Sugimura M. (1985) Morphological studies on the tongue of wild Japanese serows, *Capricornis crispus*. *Res Bull Fac Agr Gifu Univ.* 50, 205-219.
- Goodarzi N, Hoseini TS. (2015). Fine structure of lingual papillae in the Markhoz goat (Iranian Angora): A scanning electron microscopic study. *Int J Zool Res.* 11, 160-168.

- Gozdziewska-Harłajczuk K, Kleckowska-Nawrot J, Janeczek M, Zawadzki M. (2015). Morphology of the lingual and buccal papillae in alpaca (*Vicugna pacos*) – Light and scanning electron microscopy. *Anat Histol Embryol.* 44, 345-360.
- Harem İŞ, Karadağ Sarı E, Koçak Harem M. (2009). Akkaraman koyununda dorsal dil papillalarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik yapısı. *Kocatepe Vet J.* 2, 8-14.
- Iwasaki S. (2002). Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. *J Anat.* 201, 1-13.
- Karadağ Sarı E, Koçak Harem M, Harem İS. (2010). Characteristics of dorsal lingual papillae of Zavot cattle. *J Anim Vet Adv.* 9, 123-130.
- Kocak Harem M, Harem İS, Karadağ Sarı E, Aydın MF. (2011). Light and scanning electron microscopic study of the dorsal lingual papillae of the Goitered Gazelle (*Gazelle subgutturosa*). *J Anim Vet Adv.* 10, 1906-1913.
- Kumar P, Kumar S, Singh Y. (1998). Tongue papillae in goat: a scanning electron-microscopic study. *Anat Histol Embryol.* 27, 355-357.
- Kurtul I, Atalgin SH. (2008). Scanning electron microscopic study on the structure of the lingual papillae of the Saanen goat. *Small Rumin Res.* 80, 52-56.
- Qayyum MA, Fatani JA, Mohajir AM. (1988). Scanning electron microscopic study of the lingual papillae of the one humped camel, *Camelus dromedarius*. *J Anat.* 160, 21-26.
- Tabata S, Wada A, Kobayashi T, Nishimura S, Muguruma M, Iwamoto H. (2003). Bovine circumvallate taste buds: taste cell structure and immunoreactivity to α -Gustducin. *Anat Rec.* 271A, 217– 224.
- Tabata S, Kudo KI, Wada-Takemura A, Nishimura S, Iwamoto H. (2006). Structure of bovine fungiform taste buds and their immunoreactivity gustducin. *J Vet Med Sci.* 68, 953-957.
- Tadjalli M, Pazhoomand R. (2004). Tongue papillae in lambs: a scanning electron microscopic study. *Small Rumin Res.* 54, 157-164.
- Takayuki Y, Tomoichiro A, Kobayashi K. (2002). Comparative anatomical studies on the stereo structure of the lingual papillae and their connective tissue cores in the Japanese serow and Bighorn sheep. *Jap J Oral Biol.* 44, 127-141.
- Yanping D, Shiyuan Y, Baoping S. (2016). Anatomical and histological characteristic of the tongue and tongue mucosa linguae in the cattle-yak ($\times$). *Front Biol.* 11, 141-148.
- Yoshimura K, Hama N, Shindo J, Kobayashi K, Kageyama I. (2009). Light and scanning electron microscopic study on the tongue and lingual papillae of the hippopotamus, Hippopotamus amphibious. *Anat Rec.* 292, 921-934.
- Zheng JH, Kobayashi K. (2006). Comparative morphological study on the lingual papillae and their connective tissue cores (CTC) in Reeves Muntjac deer (*Muntiacus reevesi*). *Ann Anat.* 188, 555-564.



Oleanolik asidin çekal ligasyon ve punksiyon ile sepsis oluşturulan ratlarda kalp hasarı üzerine etkileri

Hüseyin Serkan Erol^{1*}, Tuba Aydın², Serkan Yıldırım³, Mohammad Alhilal⁴,
Muhammet Bahaeddin Dörtbudak⁵, Kübra Coşar⁶, Mesut Bünyami Halıcı⁷

¹ Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kastamonu, Türkiye

² Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ağrı, Türkiye

³ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁴ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁵ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁶ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁷ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 09.10.2020, Kabul tarihi / Accepted: 30.10.2020

Özet: Bu çalışmada zeytin ağacı (*Olea europaeae*) ağacının yaprağından saflaştırılan oleanolik asidin (OEA) ratlarda çekal ligasyon ve punksiyonla (CLP) indüklenen sepsisin oluşturduğu kalp hasarı üzerine etkileri incelendi. Her gruba eşit olacak şekilde 30 adet Wistar erkek rat sham, sepsis, OEA-150, OEA-300 ve CEFT olarak 5 gruba ayrıldı. Kromatografik metotlarla zeytin yaprağından saflaştırılan oleanolik asit OEA gruplarına 150 ve 300 mg/kg dozlarında oral yolla uygulandı. CEFT grubuna seftriakson 150 mg/kg dozda intraperitoneal yolla uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra ratlardan kan serumu ve kalp dokuları, histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler için alındı. Yapılan histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemede, sepsis grubunun doku tümör nekrozis faktör (TNF)- α ve interlökin (IL)-1 β ekspresyonlarında artış, myokartta kas liflerinde şiddetli düzeyde hyalin dejenerasyon, Zenker nekrozu ve damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi gözlemlendi. OEA ve seftriakson (CEFT) sitokin ekspresyonlarında ve histopatolojik bulgulara azalma sağladı. Sepsis, doku superoksit dismutaz aktivitesini (SOD) azalttı. Ayrıca lipid peroksidasyonu (LPO) ve glutatyon (GSH) seviyeleri ile doku katalaz (KAT), serum kreatin kinaz (CK-MB) ve serum laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitelerini önemli şekilde arttırdı. OEA ve CEFT, SOD aktivitesini önemli derecede arttırırken diğer parametrelerde belirgin düşüşe neden oldu. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında oleanolik asidin sepsis sırasında oluşan kalp dokusu hasarının azaltılmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: İnflamasyon, Kalp, Oleanolik asit, Seftriakson, Sepsis.

The effects of oleanolic acid on heart injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats

Abstract: In the present, the effects of oleanolic acid (OEA) purified from leaf of the olive tree (*Olea europaeae*) on heart damage caused by cecal ligation and puncture (CLP) induced sepsis model in rats were examined. Thirty Wistar rats equally were divided into six groups as sham, sepsis, OEA-150, OEA-300 and CEFT. Oleanolic acid purified from olive leaf by chromatographic methods was orally administered at doses of 150 and 300 mg/kg to OEA groups. Ceftriaxone was intraperitoneally administered at a dose of 150 mg/kg to the CEFT group. Twenty-four hours after the application, blood serum and heart tissues were taken from rats for histopathological, immunohistochemical and biochemical analysis. In histopathological and immunohistochemical examination, an increase in tissue tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β expressions of the sepsis group, severe hyaline degeneration in muscle fibers in the myocardium, Zenker necrosis and severe hyperemia in the vessels were observed. OEA and ceftriaxone (CEFT) provided a decrease in cytokine expressions and histopathological findings. Sepsis reduced tissue superoxide dismutase activity (SOD). It also significantly increased lipid peroxidation (LPO), glutathione (GSH) levels, catalase (CAT), serum creatine kinase (CK-MB) and serum lactate dehydrogenase (LDH) activities. OEA and CEFT significantly increased SOD activity while causing a significant decrease in other parameters. In the light of the findings from this study, it is thought that oleanolic acid may be beneficial in reducing heart tissue damage during sepsis.

Keywords: Ceftriaxone, Heart, Inflammation, Oleanolic acid, Sepsis.

Giriş

Sepsis, enfeksiyona bağlı olarak gelişen sistemik inflamatuvar yanıt ve çoklu organ yetmezliği ile

seyreden ölümcül bir sendromudur. Ayrıca yoğun bakım ölümlerinin en önemli sebeplerinden biridir. Türkiye’de bu oranlar ağır sepsis vakalarında %55,7,

Yazışma adresi / Correspondence: Hüseyin Serkan Erol, Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Oda no:117 Kastamonu
E-Posta: hserol@kastamonu.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-9121-536X • ²0000-0002-7653-6480 • ³0000-0003-2457-3367 • ⁴0000-0002-2832-8409 • ⁵0000-0001-5777-964X • ⁶0000-0002-8237-0739 • ⁷0000-0002-7473-2955

septik şok vakalarında ise %70.4 olduğu rapor edilmiştir (Baykara ve ark. 2018). Sepsis koagülasyon mekanizmasında aksaklıklar meydana getirerek mikrovasküler konjesyon ve iskemiye neden olur. Bu durum doku hasarı ve ölümünün temellerini oluşturur (Simmons ve Pittet 2015). Sepsis için uygulanan tedaviler her ne kadar hastalığın belirtilerini azaltsa da tedavi sonrası organlarda kalıcı hasarlar meydana gelmektedir. Sepsis sırasında organ ve dokular da meydana gelen yıkım; sepsis sonrası dönemde önemli doku veya organ kayıpları, uzun dönem tedavi ihtiyacı ve kronik hastalıklar gibi risklerin ortaya çıkmasına neden olur (Winters ve ark. 2010). Bu nedenle sepsis sırasında doku ve organların korunarak hasar oluşumunu önlemek tedavi sonrasında bu riskleri azaltabilmektedir.

Şiddetlenen sistemik inflamatuvar yanıt kalp gibi hayati organlarda oksidatif stresi meydana getirir. Oksidatif strese artan süperoksit (O_2^-), peroksil (RO_2) ve hidroksil ($OH^\cdot$) radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS) hücrel membranlarda bulunan fosfolipidlerin yanı sıra yapısal proteinler ve hatta DNA'da hasar meydana getirir. Bu durum apoptozisi tetikler ve yaygın doku hasarına sebep olur. Ayrıca dokularda $TNF-\alpha$ ve $IL-1\beta$ gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını ve salınımını artırır. Sitokin salınımı önce nötrofillerin ve mononükleer hücrelerin aktivasyonunu, sonrasında ise bu hücrelerin doku içine göçünü sağlar (Cadirci ve ark. 2010). Sepsiste ilerleyen inflamatuvar süreç ROS'ler ile güçlenerek sitokin kaskadı olarak da isimlendirilen git gide güçlenen sitokin fırtınasına dönüşür (Chousterman ve ark. 2017). Bu sebeple son yıllarda sepsisin tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda sitokin salınımını azaltmanın yanı sıra ROS oluşumunun da engellenmesinin sepsis sonucu meydana gelen doku ve organ hasarının azalttığını ve ayrıca mortalite oranını da düşürdüğü bildirilmektedir (Yun ve ark. 2009; Cadirci ve ark. 2010; Petronilho ve ark. 2016).

Oleanoleik asit (OEA) zeytin yağında ve yaprağında bulunan pentasiklik triterpen yapısında bir moleküldür ve kimyasal olarak 3 β -hidroksi-olea-12-en-28-oik asit şeklinde isimlendirilir (Liu 1995). Daha önceki çalışmalarda OEA ve türevlerinin güçlü antioksidan, anti-inflamatuvar, antikolinesteraz, hepatoprotektif, antikanser, nöroprotektif ve immünomodülatör gibi birçok özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Liu 1995, 2005; Topçu ve ark. 2013).

Sepsis tedavisinde çok çeşitli medikal tedaviler denenmiş olsa da meydana gelen yaygın doku hasarını önleyecek yeterli bir tedavi hala bulunmamaktadır. Ancak sepsis ile ilişkili mekanizmaların aydınlatılmasıyla daha etkili bir tedavi geliştirilebi-

lecektir. Bu sebeple mevcut çalışmada OEA'nın çekal ligasyon ve punksiyon (CLP) yöntemiyle oluşturulan sepsisin kalp dokusu üzerine etkilerinin oksidatif stres ve inflamasyon parametreleri üzerinden biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca oksidatif stres ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için kalp dokusunun bazı antioksidan parametreleri ile inflamatuvar sitokinlerindeki değişimler incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Oleanolik asit molekülünün saflaştırılması ve moleküler identifikasyonu

Çalışmada kullanılan OEA, daha önce Kısa ve ark. (2018) tarafından belirtilen şekilde, kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırıldı ve doğrulandı. İnce tabaka kromatografisi (TLC) için hazır silika jel 60 (60F-254, Merck, ABD) kullanıldı. Oluşan spotlar sülfik asit içinde hazırlanan %1'lik vanilin çözeltisi ile 110°C'de ısıtılarak UV254 ve UV356 dalga boylarında görünür hale getirildi. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi (Nicolet iS10, Thermoscientific, ABD) kullanılarak 4000 – 400 cm^{-1} dalga boylarında spektrumları kaydedildi. Madde yapısının belirlenmesinde nükleer rezonans spektroskopisi (NMR) ile 1H NMR ve ^{13}C NMR (400, Bruker, ABD) kullanıldı.

Çalışmada Eylül ayında Kilis bölgesinden toplanan zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprakları uluslararası teşhis yöntemleri kullanılarak Tuba Aydın tarafından teşhis edildi ve kurutulmaya bırakıldı. Toplanan yapraklar toz haline getirildi (300 gr) ve etil alkol ile 5 kez muamele edilerek ekstrakte edildi. Filtrasyondan sonra döner rotor bir evaporatör ile vakum altında etil alkol uzaklaştırıldı. Geriye kalan koyu kahverengi çökelti (85 gr) 4 kez 250 ml etil asetat ile muamele edildi. Böylelikle etil asetatta çözünen ve çözünmeyen olarak iki faz elde edildi. Çözünen kısım (50.5 gr) 250 ml n-hekzan ile 3 kere muamele edildi ve çözünmüş kısım uzaklaştırılarak geriye yeşilimsi amorf katı kısım (35 gr) kaldı. Bu kısımdan kolon kromatografisi ile silika jelde (250 gr, Merck, 70-230 mesh, ABD) diklorometan-etil asetat (8:2) hareketli fazı ile Fr1-4 olarak isimlendirilen dört fraksiyon elde edildi. İlk iki fraksiyon ayrılarak üçüncü fraksiyon Fr3 (12.3 gr) için diklorometil-etil asetat ile iki farklı oranda (8:2 ve 6:4) hareketli fazlar oluşturuldu ve kolon kromatografisi ile silika jelde (150 gr, Merck, 230-400 mesh, ABD) ayrıştırıldı. Bu işlemde iki majör madde elde edildi ve kodlandı. Yapılan spektral analizlerde "ZY-1" olarak kodlanan maddenin OEA (4.8 gr) olduğu tespit edildi. Elde edilen OEA'ya ait spektral analiz bilgileri aşağıda verilmiştir.

Oleanolik asit (ZY-1): beyaz amorf. IR $\nu_{\max}$ (ATR): 3393 cm^{-1} (br. -OH), 2800-3000 cm^{-1} (güçlü -CH), 1687 cm^{-1} (C=O), 1028 cm^{-1} (C-O). $^1\text{H-NMR}$ (δ , ppm) (DMSO- d_6): 5.23 (t, $J=2.88, 3.12$ Hz, H-12); 3.14 (dd, $J_1=7.58$ Hz, $J_2=6.50, 6.40$ Hz, H-3); 2.84 (dd, $J_1=13.74$ Hz, $J_2=3.96, 3.84$ Hz, H-18); 2.01 (td, $J_1=10.66$ Hz, $J_2=2.92, 2.36$ Hz, H-2); 1.82 (m, H-11); 1.60 (t, $J=8.80$ Hz, H-9); 1.41 (m, H-6). $^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm) (DMSO- d_6): 179.9 (28); 144.0 (13); 122.5 (12); 78.5 (3); 55.6 (5); 47.6 (9); 46.1 (19); 46.5 (17); 41.7 (14); 41.6 (18); 22.9 (16); 38.8 (4); 37.2 (10); 39.4 (8); 33.7 (21); 32.4 (29); 32.6 (7); 30.4 (20); 27.6 (23); 28.1 (15); 27.8 (1); 26.7 (27); 23.3 (11); 22.8 (30); 26.5 (2); 18.3 (6); 16.7 (26); 14.8 (24); 15.4 (25).

Hayvan modeli

Bu çalışma için gerekli izin Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Toplantı No:13, Karar no: 164). Deneyde 30 adet erkek Wistar Albino cinsi rat (220-250 gr) sham, sepsis, OEA-150, OEA-300 ve CEFT olarak 5 eşit gruba ayrıldı. Çalışma öncesinde ratlar 12/12 saatlik aydınlık/karanlık, 25°C oda sıcaklığı, *ad libitum* yem ve su olan standart şartlarda 1 hafta bekletildi. Çalışmada kullanılan OEA'nın dozu daha önce Singh ve ark. (1992) tarafından bildirilen anti-inflamatuvar etkinin gözlemlendiği değerler dikkate alınarak belirlendi. OEA 150 ve 300 mg/kg dozlarında su içinde süspanse edilerek oral olarak, referans olarak kullanılan seftriakson (CEFT) ise 150 mg/kg dozda hazırlanarak intraperitoneal olarak CLP uygulamasından 15 dakika önce verildi. Çalışmada uygulanan CLP modeli daha önce Cadirci ve ark. (2010) tarafından bildirilen metoda uygun olarak yapıldı. Anestezi olarak ksilazin-ketamin uygulamasından sonra CLP sağ abdomen bölgesinden yapılan ensizyon ile gerçekleştirildi. Ensizyon hattından dışarı çıkarılan sekum 20-gaujlu bir kanül ile karşılıklı olarak dört adet olacak şekilde delinerek perfor edildi. Ortalama apendiksten 1 cm aşağıdan 2-0 ipek iplik kullanılarak ligatüre edildi ve parmak ucuyla bir miktar sıkılarak feçesin dışarı çıkarak etrafına yayılması sağlandı. Tekrar abdomen içine yerleştirilerek 2-0 katküt kullanılarak sütüre edildi. Uygulamadan 24 saat sonra ratlar yüksek doz ksilazin-ketamin anestezisi (7,5 mg/kg ksilazin, 100 mg/kg ketamin) altında servikal dislokasyon uygulanarak ötenazi edildi. Serum için kardiyak punktur ile 5 ml'lik steril enjektöre alınan kan kırmızı kapaklı serum tüpüne konularak +4°C 7 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Serumlar eppendorf tüplere alınarak deney gününe kadar -20°C derin dondurucuda saklandı. Daha sonra kalp dokusu histopatoloji için %10'luk formalin solüsyonu içerisine, biyokimyasal

parametreler için ise steril petri kabına alındı. Petri kapları deney gününe kadar -20°C'de saklandı.

Doku homojenatlarının hazırlanması

Petri kabına alınan dokular sıvı nitrojen ile porselen bir havan yardımıyla toz haline getirildi. Daha sonra 25 mg olarak steril eppendorf tüplerine tartılarak üzerlerine parametreye uygun olan homojenat tamponları (LPO: %10 KCl, SOD: 50 mM KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, GSH: 50 mM Tris-HCl ve KAT: 50 mM KH_2PO_4 , pH 7) eklendi. Tampon içindeki dokular 5 mm çelik bilye ile bir doku homojenizatörü (Qiagen Tissuelyser II, Almanya) kullanılarak 35 Hz frekansa 1 dakika boyunca homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Hettich Rotina 320R, Almanya) +4°C'de LPO ve GSH için 4000 rpm 30 dakika, SOD için 6000 rpm 1 saat ve KAT için 8500 rpm 1 saat olarak santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar daha sonra ölçüm metotlarına uygun şekilde kullanıldı.

Doku lipid peroksidasyonu ve glutatyon seviyeleri ile süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin belirlenmesi

Doku LPO seviyesinin belirlenmesi için tiyobarbitürik asit ile malondialdehit arasında bir reaksiyonu temel alan, Ohkawa ve ark. (1979) tarafından tanımlanan metot kullanıldı. Doku LPO seviyesinin hesaplanmasında spektrofotometre (Bio-Tek EPOCH, ABD) ile 532 nm'de okunan absorbanslar 1,1,3,3-tetraethoksiopropan ile oluşturulan standart grafik kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol MDA/gr doku olarak ifade edildi.

Doku SOD aktivitesinin belirlenmesinde için daha önce Sun ve ark. (1988) tarafından tanımlanan, ksantin oksidaz aktivitesi ile meydana gelen süperoksit radikallerinin oluşturduğu formazan boyasının belirlenmesine dayanan bir metot kullanıldı. Aktivitenin belirlenmesi için 560 nm'de okunan absorbanslar metotta belirtilen formülasyonla hesaplanarak U/mg doku olarak ifade edildi.

Doku GSH seviyesinin tespitinde Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından tarif edilen, 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) ile GSH'nin sülfidril grubu arasında meydana gelen reaksiyona dayanan bir metottan faydalanıldı. Deney sonunda 412 nm'de okunan absorbanslar ile indirgenmiş GSH ile hazırlanan standart grafik kullanılarak sonuçlar hesaplanarak nmol/mg doku olarak ifade edildi.

Doku KAT aktivitesi H_2O_2 'in enzimatik bir reaksiyonla suya dönüşümünden faydalanan ve Aebi (1984) tarafından tarif edilen metot kullanılarak be-

lirildi. Örnekler 240 nm'de kinetik olarak okunduktan sonra metotta belirtilen formül ile hesaplanarak $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ doku olarak ifade edildi.

Serum kreatin kinaz-MB ve laktat dehidrojenaz aktivitesinin belirlenmesi

Serum kreatin kinaz (CK-MB) ve laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitelerinin belirlenmesinde ticari kitler (Erba Lachema XL SysPack, Çekya) kullanıldı ve analizler kit ile beraberinde gelen prosedür talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar normal, patolojik ve multi standart serumları (ERBA Norm, ERBA Path, ERBA Multi, Çekya) ile hazırlanan standart grafik kullanılarak hesaplandı ve U/L olarak ifade edildi.

Histopatolojik olarak dokuların hazırlanması ve incelenmesi

Nekropsiden elde edilen kalp dokusu %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat fikse edildikten sonra taze su ile 10 saat yıkandı. Dokular parafin bloklara gömüldü ve her blokta 4 μm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlar bir ışık mikroskobu altında incelendi. Patolojik bulgular (miyokartta hyalin dejenerasyonu, Zenker nekrozu ve damarlarda hiperemi) derecesine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak skorlanarak doku hasar seviyesi belirlendi.

İmmünohistokimyasal analiz ve ekspresyonun belirlenmesi

Histopatolojik analiz için hazırlanmış olan preparatlar immünoperoksidaz inceleme için artan alkol konsantrasyonlarından geçirilerek ksilol ile dokudaki su uzaklaştırıldı. Endojen peroksidaz inaktivasyonu için PBS banyosu sonrası 10 dakika %3'lük H_2O_2 solüsyonunda inkübe edildi. Bu yıkama ve inkübasyon işlemleri iki defa tekrarlandıktan sonra antijenleri tespit eden retrieval solüsyonu ile iki defa tekrarlı 500 watt mikro dalga uygulaması yapıldı. Soğutulduktan sonra örnekler TNF- α (sc-52746, Santa Cruz, ABD) ve IL-1 β (sc-52012, Santa Cruz, ABD) antikorları ile immünohistokimya kit (ab64264, Abcam HRP/DAB Detection IHC kit) prosedüründe tarif edilen şekilde 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kromojen olarak kit ile temin edilen 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kullanıldı. Zemin hematoksilen ile boyanarak kesitler immünopozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen biyokimyasal parametreler Prism 8.0 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Grupların kıyas-

lanmasında ANOVA (Tek yönlü varyans analizi) kullanılarak çoklu grup kıyaslaması için Tukey testi gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde $P<0.05$ değeri anlamlı, $P<0.01$ değeri çok anlamlı, $P<0.001$ değeri ise yüksek derecede anlamlı olarak değerlendirildi. Histopatolojik ve immünohistokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinde semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı.

Bulgular

Doku lipit peroksidasyon seviyesi

Doku LPO seviyesinin sepsis grubunda (526.2 ± 25.98) sham grubu (314.0 ± 17.70) ile kıyaslandığında CLP uygulaması ile önemli derecede arttığı tespit edildi ($P<0.001$). Tedavi olarak uygulanan CEFT (428.2 ± 18.58) ($P<0.001$), OEA-150 (363.4 ± 22.65) ve OEA-300 (352.8 ± 21.53) ($P<0.05$) gruplarında düşüş tespit edildi ($P<0.001$) (Şekil 1A).

Doku süperoksit dismutaz aktivitesi

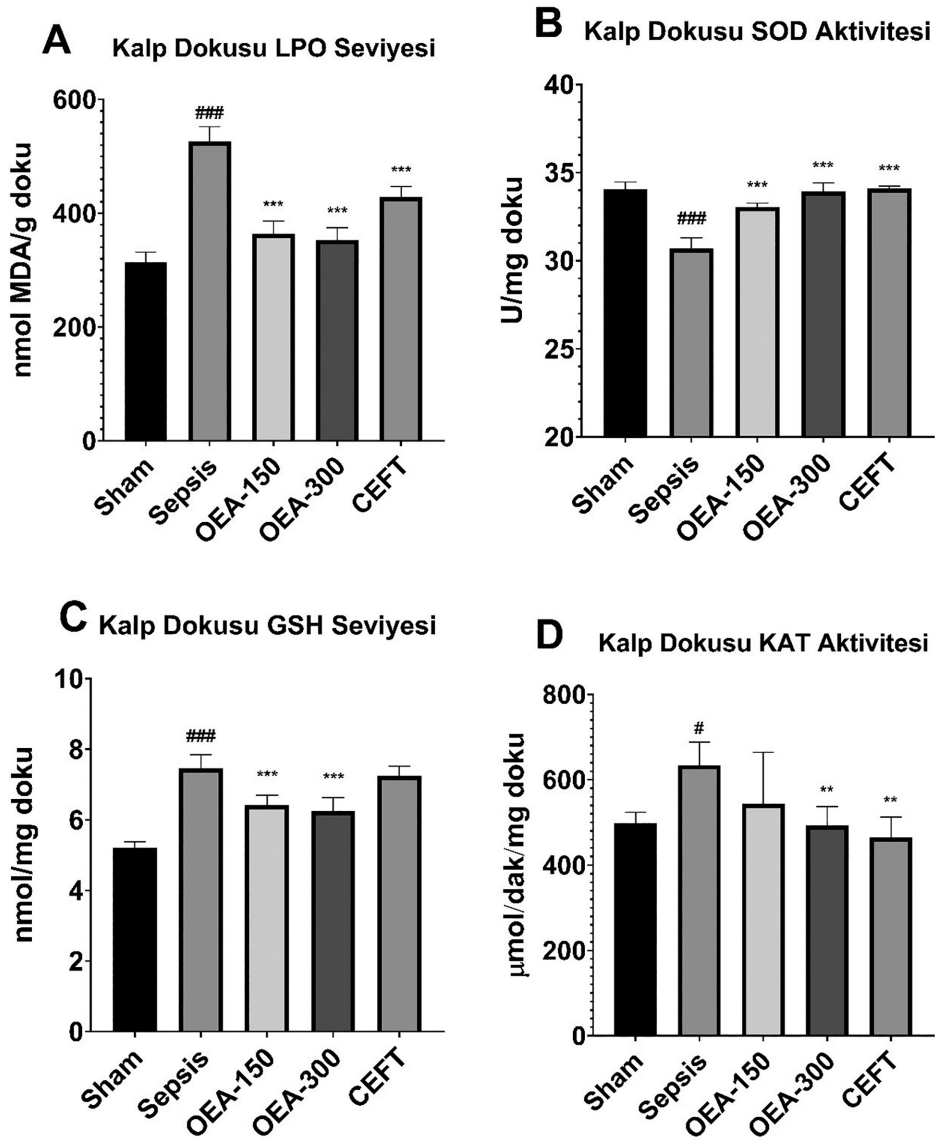
Doku SOD aktivitesi sham grubu (34.05 ± 0.42) ile kıyaslandığında sepsis grubunda (30.70 ± 0.61) düştüğü tespit edildi ($P<0.001$). Tedavi olarak uygulanan CEFT (34.08 ± 0.14), OEA-150 (33.05 ± 0.22) ve OEA-300 (33.93 ± 0.49) gruplarında sepsis grubu ile kıyaslandığında azalan aktivitenin arttığı belirlendi ($P<0.001$) (Şekil 1B).

Doku glutatyon seviyesi

Doku GSH seviyesinin sham grubuna (5.21 ± 0.17) kıyasla sepsis grubunda (7.46 ± 0.39) arttığı tespit edildi ($P<0.001$). Tedavi olarak uygulanan OEA-150 (6.43 ± 0.27) ve OEA-300 (6.25 ± 0.38) artan bu seviyeyi düşürse de ($P<0.001$) CEFT (7.24 ± 0.28) grubundaki azalma istatistiksel olarak önemli değildi ($P>0.05$) (Şekil 1C).

Doku katalaz aktivitesi

Doku KAT aktivitesi sham grubu (498.5 ± 25.51) ile kıyaslandığında sepsis grubunun (634.5 ± 53.64) aktivitesinde artış tespit edildi ($P<0.05$). Tedavi olarak uygulanan CEFT (465.3 ± 47.50) ve OEA-300 (492.9 ± 44.36) gruplarında artan bu aktivite önemli seviyede düştüğü belirlendi ($P<0.01$). Fakat OEA-150 (543.7 ± 120.8) grubundaki düşüş sepsis grubu (634.5 ± 53.64) ile kıyaslandığında anlamlı bulunmadı ($P>0.05$) (Şekil 1D).



Şekil 1. Kalp dokusu antioksidan parametreleri. Kalp dokusu LPO seviyesi **A**, Kalp dokusu SOD aktivitesi **B**, Kalp dokusu GSH seviyesi **C**, Kalp dokusu KAT aktivitesi **D**.

OEA: Oleanolik asit, CEFT: Seftriakson. #Sham vs Sepsis, $P < 0.05$; ##Sham vs Sepsis, $P < 0.01$; ###Sham vs Sepsis, $P > 0.001$. *Sepsis vs Tedavi, $P < 0.05$; **Sepsis vs Tedavi, $P < 0.01$; ***Sepsis vs Tedavi, $P < 0.001$.

Serum kreatin kinaz ve laktat dehidrojenaz aktiviteleri

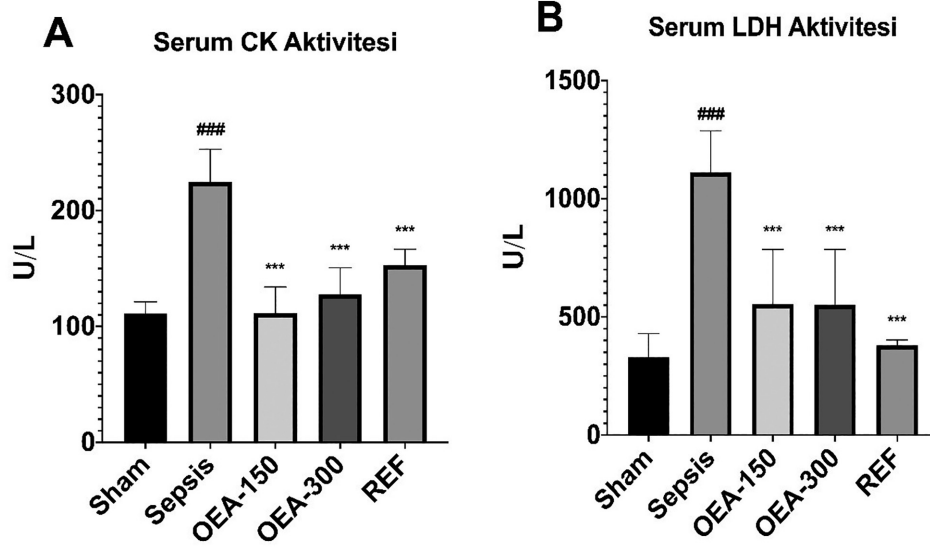
Şekil 2A ve 2B'de gösterilen sepsis grubu serum CK-MB (224.5 ± 28.5) ve LDH (1112 ± 175.0) aktiviteleri sham grubu CK-MB (111.2 ± 10.0) ve LDH (330.3 ± 98.9) aktiviteleri ile kıyaslandığında artmıştır ($P < 0.001$). Tedavi olarak uygulanan CEFT (CK-MB: 153.0 ± 13.71 , LDH: 379.2 ± 23.0), OEA-150 (CK-MB: 111.6 ± 22.4 , LDH: 554.2 ± 230.6) ve OEA-300 (CK-MB: 127.5 ± 23.21 , LDH: 551.8 ± 233.6) artan bu aktiviteleri azalttığı belirlendi ($P < 0.001$).

Kalp dokusunun histopatolojik incelemesi

Kalp dokularının histopatolojik incelenmesinde, sham grubunda myokart, endokart ve perikart tabakalarının normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 3A). Sepsis grubunun myokartının kas liflerinde şiddetli düzeyde hyalin dejenerasyonu ve Zenker nekrozu gözlemlendi. Damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi ve hemoraji belirlendi (Şekil 3B). OEA-150 grubunun damarlarında orta düzeyde hiperemi, kas liflerinde orta düzeyde hyalin dejenerasyonu ve zenker nekrozu olduğu belirlendi (Şekil 3C). OEA-300

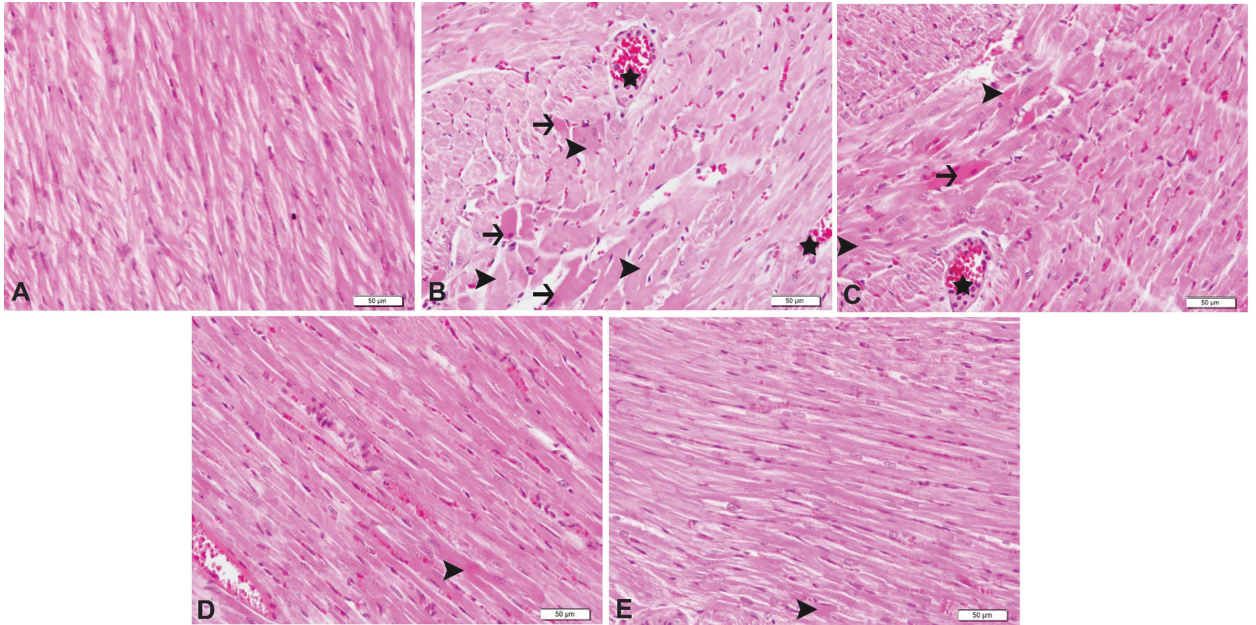
grubunun kas liflerinde hafif düzeyde hyalin dejenerasyonu ve damarlarda hiperemi olduğu gözlemlendi (Şekil 3D). CEFT grubunun kas liflerinde hafif düzey-

de dejenerasyon, Zenker nekrozu ve damarlarda hiperemi belirlendi (Şekil 3E). Tüm histopatolojik bulgular Tablo 1 ile özetlendi.



Şekil 2. Serum CK-MB ve LDH aktiviteleri

OEA: Oleanolik asit, CEFT: Seftriakson. [#]Sham vs Sepsis, $P < 0.05$; ^{##}Sham vs Sepsis, $P < 0.01$; ^{###}Sham vs Sepsis, $P > 0.001$. ^{*}Sepsis vs Tedavi, $P < 0.05$; ^{**}Sepsis vs Tedavi, $P < 0.01$; ^{***}Sepsis vs Tedavi, $P < 0.001$.

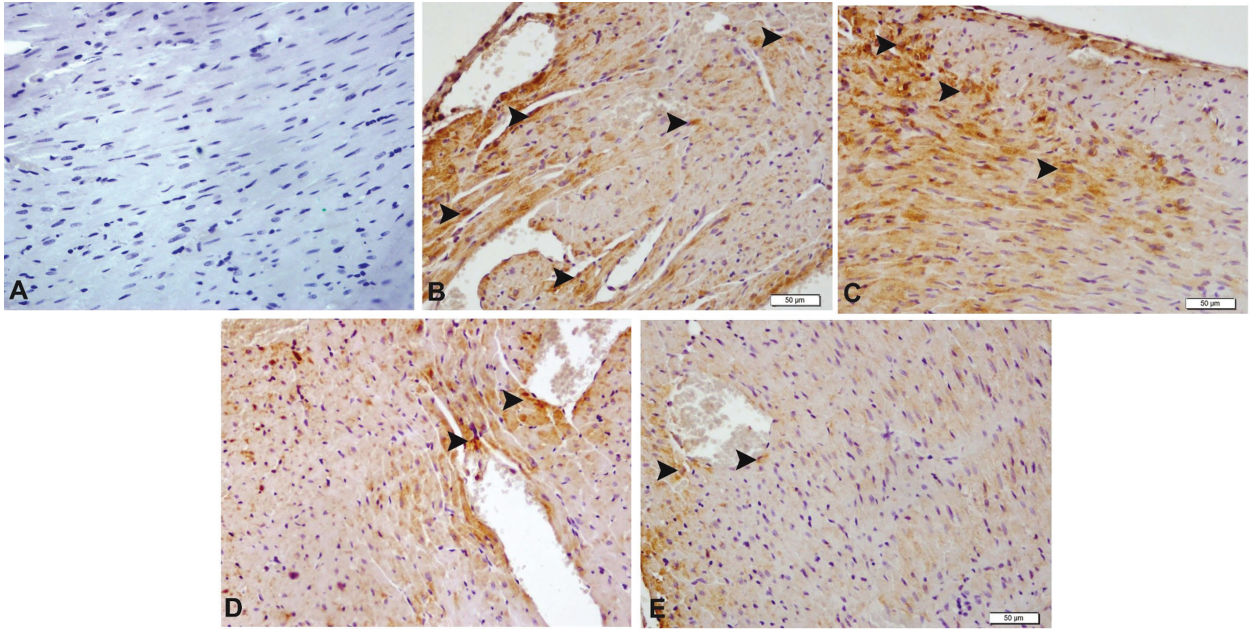


Şekil 3. Kalp dokusu, **sham grubu**, normal histolojik görünüm (**A**), **sepsis grubu**, şiddetli düzeyde kas liflerinde hyalin dejenerasyonu (ok başları), Zenker nekrozu (ince oklar), damarlarda hiperemi (yıldızlar) (**B**), **OEA-150 grubu**, orta düzeyde kas liflerinde hyalin dejenerasyonu (ok başları), zenker nekrozu (ince ok), damarlarda hiperemi (yıldız) (**C**), **OEA-300 grubu**, hafif düzeyde kas liflerinde hyalin dejenerasyonu (ok başları), damarlarda hiperemi (**D**), **CEFT grubu**, hafif düzeyde kas liflerinde hyalin dejenerasyonu (ok başları), damarlarda hiperemi (**E**), H&E, Bar: 50 µm. OEA: Oleanolik asit, CEFT: Seftriakson.

Kalp dokusunun immünohistokimyasal incelemesi

Kalp dokularının immunohistokimyasal olarak incelenmesinde, sham grubunda negatif TNF- α ve IL-1 β ekspresyonu belirlendi (Şekil 4A, 5A). Kontrol grubu, şiddetli düzeyde hasarlı bölgelerde mononükleer hücrelerde ve perivasküler yerleşimli TNF- α ekspresyonu, myokartında interstisyel aralıklarda ve perivasküler yerleşimli şiddetli düzeyde IL-1 β ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4B, 5B). OEA-150 grubunda orta şiddette hasarlı bölgelerde mononükleer hücrelerde

ve perivasküler yerleşimli TNF- α ekspresyonu, interstisyel aralıklarda ve perivasküler IL-1 β ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4C, 5C). OEA-300 grubunda hasarlı bölgelerde hafif düzeyde mononükleer hücrelerde ve perivasküler yerleşimli TNF- α ekspresyonu, interstisyel aralıklarda ve perivasküler yerleşimli hafif düzeyde IL-1 β ekspresyonu belirlendi (Şekil 4D, 5D). CEFT grubunda hafif düzeyde perivasküler yerleşimli TNF- α ve IL-1 β ekspresyonu belirlendi (Şekil 4E, 5E). Gruplara ait immünohistokimyasal bulgular Tablo 1 ile özetlendi.

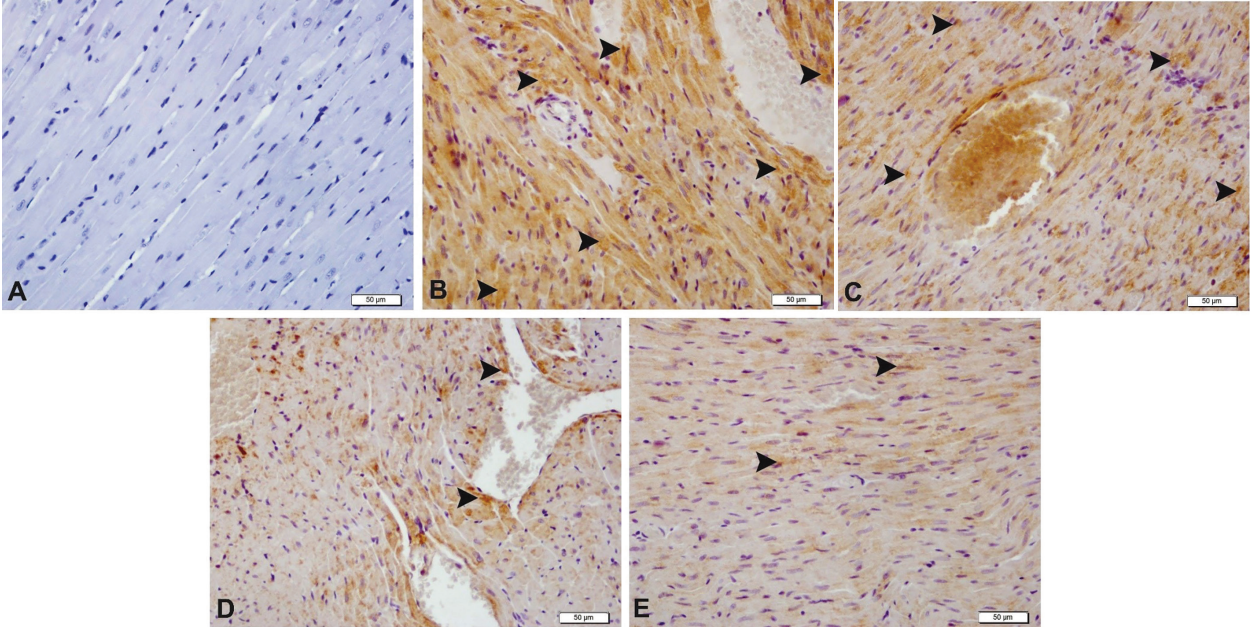


Şekil 4. Kalp dokusu, **sham grubu**, negatif TNF- α ekspresyonu (A), **sepsis grubu**, şiddetli düzeyde hasarlı bölgelerde mononükleer hücrelerde ve perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (B), **OEA-150 grubu**, orta düzeyde mononükleer hücrelerde ve perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (C), **OEA-300 grubu**, hafif düzeyde perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (D), **CEFT grubu**, hafif düzeyde perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (E), IHC-P, Bar: 50 μ m. OEA: Oleanolik asit, CEFT: Seftriakson.

Tablo 1. Kalp dokusu histopatolojik ve immünohistokimyasal bulguların skorlanması

	Sham	Sepsis	OEA-150	OEA-300	CEFT
Miyokartta hyalin dejenerasyonu	-	+++	+++	+	++
Miyokartta zenker nekrozu	-	+++	++	+	+
Damarlarda hiperemi	-	+++	+++	++	++
TNF- α	-	+++	++	+	+
IL-1 β	-	+++	++	+	+

OEA: Oleanolik asit, CEFT: Seftriakson, TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa, IL-1 β : İnterlökin -1Beta.



Şekil 5. Kalp dokusu, **sham grubu**, negatif IL-1 β ekspresyonu (**A**), **sepsis grubu**, interstisyel aralıklarda ve perivasküler IL-1 β ekspresyonu (ok başları) (**B**), **OEA-150 grubu**, orta düzeyde interstisyel aralıklarda ve perivasküler IL-1 β ekspresyonu (ok başları) (**C**), **OEA-300 grubu**, hafif düzeyde perivasküler IL-1 β ekspresyonu (ok başları) (**D**), **CEFT grubu**, hafif düzeyde perivasküler IL-1 β ekspresyonu (ok başları) (**E**), IHC-P, Bar: 50 μ m. OEA: Oleanolik asit, CEFT: Seftriakson.

Tartışma ve Sonuç

Sepsis sırasında meydana gelen oksidatif stres sonucunda üretilen ROS'ler hücrenin hayati yapıları olan membran doymamış yağ asitleri ve proteinlere saldırır. Membranda meydana gelen oksidatif hasar sonucunda malondialdehit (MDA) ve diğer oksidasyon ürünleri ortaya çıkmaktadır. Dokudaki MDA miktarı o dokunun LPO seviyesini göstermektedir (Erol ve ark. 2019). Doksorobisin ile indüklenen kalp hasarı üzerine yapılan bir çalışmada OEA'in doku MDA miktarını azalttığını, uygulama ile azalan SOD ve KAT aktivitelerinin yanı sıra GSH miktarını da artırdığı bildirilmiştir (Goyal ve ark. 2016). Diğer yandan izoproterenol ile indüklenmiş myokardial iskemi modeli üzerine yapılan bir çalışmada OEA'in artan MDA miktarını azalttığı ve güçlü kardioprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Senthil ve ark. 2007). Çalışmada daha önceki çalışmalara paralel şekilde OEA'in kalp doku MDA miktarını düşürerek doku LPO seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalar OEA'in Vitamin E benzeri süpürücü etkiye sahip olduğunu ve hücrelerde oksidanlara karşı savunmayı başlatan Nrf2'yi aktive ederek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Marquez-Martin ve ark. 2006; Reisman ve ark. 2009). Bu çalışmada OEA'in serbest radikal miktarını azaltarak ve

antioksidan savunmayı güçlendirerek LPO seviyesinde azalmayı sağladığı düşünülmektedir.

Hücrelerde antioksidan sistemin önemli üyelerinden biri SOD'dir. Bu enzim ROS'ler üzerinde bulunan eşleşmemiş elektronu suya aktararak hidrojen peroksit oluşturur (Erol ve ark. 2019). Sepsis hücrelerde lizozomal hidrolitik enzim kaçaklarına ve yaygın doku hasarına sebep olur. Bu durumun sepsiste meydana gelen SOD aktivitesindeki azalmanın sebebi olduğu bildirilmektedir (Rocha ve ark. 2012). Çalışmada doku hasarını gösteren patolojik bulgulara paralel olarak sepsis uygulaması ile belirgin bir şekilde azalan doku SOD aktivitesinin OEA uygulaması ile önemli seviyede arttığı belirlenmiştir.

Antioksidan sistemin diğer önemli bir üyesi de bir tripeptit olan GSH'dir. Hücrede GSH, glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından bir substrat olarak kullanılır ve SOD tarafından oluşturulan H₂O₂'in suya dönüşümünde görev alır (Erol ve ark. 2019). Daha önce ratlarda CLP ile indüklenen sepsis modeli üzerine yapılmış çalışmalarda kalp GSH seviyesindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı rapor edilmiştir (Coskun ve ark. 2011; Dadkhah ve Fatemi 2011). Ancak, sepsiste glutatyon metabolizması üzerine yapılmış diğer bir çalışmada, sepsisin yoğun proinflatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-1 β) üreti-

mine, ve ayrıca bu sitokinlerin GSH sentezini arttırarak hücrede yüksek GSH seviyesine neden olduğu rapor edilmiştir (Biolo ve ark. 2007). Diğer taraftan, çalışmada kalp doku GSH seviyesinin sepsis grubunun immünohistokimyasal analizlerinde gözlenen sitokin seviyelerindeki artışla beraber belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca OEA'nin sitokin seviyeleriyle beraber GSH seviyesinde de azalma sağladığı tespit edilmiştir.

Hücrede SOD tarafından üretilen H_2O_2 'in suya dönüştürülmesini katalizleyen bir diğer önemli yapıda KAT enzimidir. Ratlarda CLP ile indüklenen sepsis üzerine yapılan bir çalışmada sepsisin kalp doku KAT aktivitesini önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir (Petronilho ve ark. 2016). Ayrıca sepsis şiddetinin antioksidan sistem üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada hastalığın şiddetinin artmasıyla SOD/KAT oranında dengesizlik meydana geldiği ve bu durumun özellikle kalp dokusunda şekillendiği bildirilmiştir (Andrades ve ark. 2005). Benzer şekilde mevcut çalışmada kalp KAT aktivitesi CLP uygulamasıyla birlikte belirgin şekilde artarken OEA'in sadece 300 mg/kg dozda artan bu aktiviteyi anlamlı şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. SOD ve KAT aktivitelerinde bir oranlama yapılmamış olsa da sepsis sonucunda kalpte meydana gelen SOD aktivitesindeki düşüş ile KAT aktivitesindeki artışın bu dengesizliğin bir sonucu olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Sepsis ile meydana gelen kalp dokusu hasarında serum CK-MB ve LDH aktiviteleri önemli derecede arttığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Zhou ve ark. 2015; Ozer ve ark. 2017). Ratlarda doksorobisin ile indüklenen kardiyak toksite üzerine yapılan bir çalışmada serum CK-MB ve LDH aktivitelerinin belirgin şekilde arttığı, OEA'in ise artan bu aktiviteleri önemli derecede azalttığı rapor edilmiştir (Goyal ve ark. 2016). Önceki çalışmalara paralel olarak, mevcut çalışmada da sepsis grubunda serum CK-MB ve LDH aktiviteleri beklenen şekilde anlamlı derecede artmıştır. Bu artışların çalışmanın histopatolojik incelemesinde gözlenen sepsis tarafından oluşturulan doku hasarına bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

İnflamasyon sürecinin başlangıcında salgılanan TNF- α diğer sitokinlerin salgılanmasını uyarak pro-inflamatuvar bir görev görür (Marquez-Martin ve ark. 2006). Daha sonra TNF- α 'ya cevap olarak makrofaj, monosit ve nötrofillerden salınımı uyarılan IL-1 β kalp kontraksiyonlarını baskılayan iNOS üretimini tetikler (Drosatos ve ark. 2015). Daha önceki çalışmalarda, OEA'in, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve MafK ekspresyonlarını baskılamasıyla NF- κ B'nin üretimindeki azalmanın anti-inflamatuvar özelliğinin temelini

oluşturduğu bildirilmiştir (Marquez-Martin ve ark. 2006; Lee ve ark. 2013; Hwang ve ark. 2014). Diğer yandan daha önce lipopolisakkarit (LPS) ile nitrik oksit üretimi indüklenen RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada OEA'in güçlü bir anti-inflamatuvar molekül olarak bilinen indometazinden daha güçlü anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (Huang ve ark. 2016). Çalışmanın immünohistokimyasal sonuçlarında daha önceki çalışmalara paralel olarak OEA'in kalp dokusu TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunu azalttığı ve bu şekilde anti-inflamatuvar etki gösterdiği gözlenmiştir. Diğer yandan histopatolojik incelemede kalp dokusu myokartta kas liflerinde şiddetli düzeyde hyalin dejenerasyonu, Zenker nekrozu, damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi ve hemoraji belirlendi. Sitokin salınımı ile artan inflamatuvar yanıtın kalp dokusunda hiperemi, nekroz ve dejenerasyona sebep olduğu daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Yun ve ark. 2009; Zhang ve ark. 2017; Erol ve ark. 2020).

Sonuç olarak çalışmanın bulguları göz önüne alındığında OEA uygulamasının CLP ile indüklenen sepsis modelinde kalp dokusu hasarını azalttığı ve oksidatif hasarı engellediği tespit edilmiştir. OEA bu etkiyi kalp dokusu TNF- α ve IL-1 β sitokinlerinin üretimini baskılamasının yanı sıra, SOD, KAT ve GSH gibi antioksidan parametrelerinde düzelmeler gerçekleştirerek sağlamıştır. Böylece dokuda MDA seviyesi düşmüş ve histopatolojik bulguların şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında OEA'in sepsiste meydana gelen kalp dokusu hasarının azaltılmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 30.11.2017 tarihli 13 nolu toplantının 165 nolu kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

Kaynaklar

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Andrades M, Ritter C, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. (2005). Oxidative Parameters Differences during Non-Lethal and Lethal Sepsis Development1. *J Surg Res.* 125, 68-72.
- Baykara N, Akalin H, Arslantaş MK, Hancı V, Çağlayan Ç, Kahveci F, Demirağ K, Baydemir C, Ünal N, Özdemir P, Ulusoy H, Memiş D. (2018). Epidemiology of sepsis in intensive care units in Turkey: a multicenter, point-prevalence study. *Crit Care.* 22, 93
- Biolo G, Antonione R, De Cicco M. (2007). Glutathione metabolism in sepsis. *Crit Care Med.* 35, S591-S595.
- Cadirci E, Altunkaynak BZ, Halici Z, Odabasoglu F, Uyanik MH, Gundogdu C, Süleyman H, Halici M, Albayrak M, Ünal B. (2010). α -lipoic acid as a potential target for the treatment

- of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. *Shock*. 33, 479-484.
- Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 39, 517-528.
- Coskun AK, Yigiter M, Oral A, Odabasoglu F, Halici Z, Montes O, Cadirci E, Atalay F, Suleyman H. (2011). The effects of Montelukast on antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines on the heart, liver, lungs, and kidneys in a rat model of cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Sci World J*. 11, 1341-1356.
- Dadkhah A, Fatemi F. (2011). Heart and kidney oxidative stress status in septic rats treated with caraway extracts. *Pharm Biol*. 49, 679-686.
- Drosatos K, Lymperopoulos A, Kennel PJ, Pollak N, Schulze PC, Goldberg IJ. (2015). Pathophysiology of sepsis-related cardiac dysfunction: driven by inflammation, energy mismanagement, or both? *Curr Heart Fail Rep*. 12, 130-140.
- Erol H, Aydin T, Yildirim S, Can I, Halici M. (2020). The effects of oleuropein on lung and heart injury in cecal ligation and puncture - induced sepsis. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*. 36, 221-231.
- Erol N, Saglam L, Saglam YS, Erol HS, Altun S, Aktas MS, Halici MB. (2019). The Protection Potential of Antioxidant Vitamins Against Acute Respiratory Distress Syndrome: a Rat Trial. *Inflammation*. 42, 1585-1594.
- Goyal SN, Mahajan UB, Chandrayan G, Kumawat VS, Kamble S, Patil P, Agrawal YO, Patil CR, Ojha S. (2016). Protective effect of oleanolic acid on oxidative injury and cellular abnormalities in doxorubicin induced cardiac toxicity in rats. *Am J Transl Res*. 8, 60-69.
- Huang J, Wang Y, Li C, Wang X, He X. (2016). Anti-inflammatory oleanolic triterpenes from Chinese Acorns. *Molecules*. 21, 669.
- Hwang Y-J, Song J, Kim HR, Hwang KA. (2014). Oleanolic acid regulates NF- κ B signaling by suppressing MafK expression in RAW 264.7 cells. *BMB reports*. 47, 524-529.
- Kısa A, Akyüz M, Çoğun HY, Kordali Ş, Bozhüyük AU, Tezel B, Şiltelioğlu U, Anıl B, Çakır A. (2018). Effects of Olea europaea L. leaf metabolites on the tilapia (*Oreochromis niloticus*) and three stored pests, *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum* and *Acanthoscelides obtectus*. *Rec Nat Prod*. 12, 201-215.
- Lee H, Lee IS, Choue R. (2013). Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 16, 143-152.
- Liu J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 49, 57-68.
- Liu J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol*. 100, 92-94.
- Marquez-Martin A, De La Puerta R, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P. (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*. 36, 211-217.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95, 351-358.
- Ozer EK, Goktas MT, Kilinc I, Pehlivan S, Bariskaner H, Ugurluoglu C, Iskit AB. (2017). Coenzyme Q10 improves the survival, mesenteric perfusion, organs and vessel functions in septic rats. *Biomed Pharmacother*. 91, 912-919.
- Petronilho F, Florentino D, Danielski LG, Vieira LC, Martins MM, Vieira A, Bonfante S, Goldim MP, Vuolo F. (2016). Alpha-lipoic acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. *Inflammation*. 39, 357-365.
- Reisman SA, Aleksunes LM, Klaassen CD. (2009). Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. *Biochem Pharmacol*. 77, 1273-1282.
- Rocha M, Herance R, Rovira S, Hernández-Mijares A, Victor VM. (2012). Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infect Disord Drug Targets*. 12, 161-78.
- Sedlak J, Lindsay RH. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 25, 192-205.
- Senthil S, Sridevi M, Pugalendi K. (2007). Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicol Pathol*. 35, 418-423.
- Simmons J, Pittet JF. (2015). The coagulopathy of acute sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol*. 28, 227-236.
- Singh GB, Singh S, Bani S, Gupta BD, Banerjee SK. (1992). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol*. 44, 456-458.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34, 497-500.
- Topçu G, Öztürk M, Kuşman T, Demirkoz AAB, Kolak U, Ulubelen A. (2013). Terpenoids, essential oil composition, fatty acid profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turk J Chem*. 37, 619-632.
- Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. (2010). Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med*. 38, 1276-1283.
- Yun N, Lee CH, Lee SM. (2009). Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. *Food Chem Toxicol*. 47, 1341-1348.
- Zhang J, Bi J, Liu S, Pang Q, Zhang R, Wang S, Liu C. (2017). 5-HT Drives Mortality in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Mice. *Mediators Inflamm*. 2017, 1-12.
- Zhou L, Gao M, Xiao Z, Zhang J, Li X, Wang A. (2015). Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *J Surg Res*. 195, 559-567.



Siğirlarda Trichophytosis'in teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliğinin araştırılması

Hülya Kaplan¹ , Oktay Keskin²

¹ Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi San. ve Tic. A.Ş., Şanlıurfa, Türkiye

² Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 63000, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 17.07.2020, Kabul tarihi / Accepted: 02.12.2020

Özet: Bu çalışmada, trichophytosisin serolojik teşhisinde Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'nın kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen ELISA ile tanısal duyarlılık %95,24 ve tanısal özgüllük %100 olarak bulundu. Şanlıurfa ve civarında daha önce hastalık tespit edilen 4 siğir sürüsündeki siğirlardan alınan kan serumları ELISA ile test edildi. Buna göre toplam 360 siğir serumu örneğinin 289'u (%80,3) pozitif bulundu. Sonuç olarak ELISA'nın; tanıda kullanılan izolasyon yöntemi uzun süre aldığından, kısa sürede teşhis yapabilecek bir tanı yöntemi olduğu ve bu bağlamda hastalığın teşhisine büyük oranda katkı sağlayacağı kanısına varıldı. Ayrıca çalışmada elde edilen yüksek seropositivite oranı, serumlar her ne kadar daha önce hastalık görülen çiftliklerden alınmış olsa da, yine de hastalığın bölgede yaygın olduğunu ve gerekli kontrol önlemlerinin alınmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: ELISA, mantar, siğir, *Trichophyton verrucosum*, Trichophytosis.

Evaluation of usage ELISA for diagnosis in cattle Trichophytosis

Abstract: The aim of this study was to determine the utility of ELISA in the serological diagnosis of trichophytosis. In this study, diagnostic sensitivity and specificity was found as 95.24% and 100%, respectively. Serum samples from four cattle facilities, in which the disease previously were seen, located in Şanlıurfa and its vicinity were tested with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). According to the results, 289 out of 360 (80.3%) serum samples were found as positive. As conclusion, it was thought that Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) could be a useful tool for serologic diagnosis of the trichophytosis since culture of the agent is a quite timely process. In this regard, it is evaluated that to use Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) will contribute highly to the diagnosis of the disease. On the other hand, high seropositivity rate obtained in the study indicates that trichophytosis is endemic in the region and the importance to take necessary control measures although these serum samples were collected from the farms previously infected with *Trichophyton verrucosum*.

Keyword: Cattle, ELISA, Fungi, *Trichophyton verrucosum*, Trichophytosis,

Giriş

Mantarlar; sporla çoğalan, genellikle hareketsiz, kemoorganotrofik ve klorofil içermeyen ökaryotik organizmalardır. Morfolojik form bakımından mantarlar; filamentöz küf, tek hücreli maya ve maya benzeri bir form (psödoipliksi form) olmak üzere 3'e ayrılırlar. Pleomorfik ve küresel, eliptik formda olan mayalarda çoğalma tomurcuklanma şeklinde olur. Tomurcuklar uzar kopmazsa hif benzeri bir zincir üretirler (psödohif). Küfler ise miselyum ve üreme kısmı (sporlar) olarak 2 ana bölüme ayrılmıştır. Küf miselyumları hif olarak bilinen filamentlerden oluşur (Arda 2000).

Dermatofitozis; insan ve hayvanlarda *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* türleri tarafından meydana getirilen mantar enfeksi-

yonlarıdır. Bu türler uygun ortamda üretildiklerinde morfolojik olarak hifalar ile karakterize küflerdir (Deacon 1988). İnsan ve hayvanlarda dermatofit etkenlerinin meydana getirdiği enfeksiyonlar 'Ringworm' olarak da tanımlanmaktadır (Biberstein 2004). *Trichophyton*lar pürüzsüz duvarlı, mikrokonidia ve makrokonidia üretirler. Mikrokonidialar 2-3 µm büyüklüğünde, makrokonidialar iğ biçimli fuziform şeklinde ince duvarlıdır. *Trichophyton*lar tırnak, saçlı deri ve saçsız deride dermatofitoz enfeksiyonu oluşturabilirler. Genellikle 7-10 günde ürerler. Üreyen koloniler beyaz-krem renkte, koloni tabanı kırmızı-kahve, sarı renktedir (Simpson 2000; Tel 2005).

Siğirlarda en sık görülen dermatofitoz etkeni *T. verrucosum*'dur. Klinik olarak deri lezyonları ile ka-

* Bu makale 1. Yazarın aynı adlı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Hülya Kaplan, Akçakale yolu üzeri Eyyübiye Kampüsü Eyyübiye, Şanlıurfa, e-Posta: okeskin@harran.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-5400-5144 • ²0000-0002-5977-7872

rakterizedir. Deride oluşturduğu lezyonlar dışında, kontrol ve önleminin pahalı ve zor olması sebebiyle sürü yönetimi ve ekonomisi açısından önemlidir. Sürü içinde bulunan hayvanlarda hastalık var ise hasta hayvanlardan sağlıklı hayvanlara yayılması çok kolaydır. *T. verrucosum* sporları bulundukları ortamda yaklaşık olarak 2-3 yıl canlı kalabilirler. Zoonozdurlar. Yapılan araştırmalar sonucu İsveçli ve İsviçreli çiftçilerde sırasıyla %29 ve %74 mantar enfeksiyonu görüldüğü bildirilmiştir (Haab 1991; Carlsson 1993). *T. verrucosum* sıcak havayı, nemi ve kirliliği seven fakültatif bir etkidir. Hızlıca yayılır ve canlılığını uzun süre korur. Sığırlarda trichophytosis hem hayvan sağlığı açısından hem de zoonoz olması sebebiyle insan sağlığı açısından büyük bir problemdir. Kontrol ve tedavi için aşılama en iyi seçenektir (Morrell 2011; Davidov 2018).

Trichophytosis; enfeksiyon şiddetine ve konakçının bağışıklığına bağlıdır. Trichophytosis tespit edilen sığırlarda gözlenen belirgin klinik lezyonlar alopesi, eritema, kabuklaşma, halka biçiminde lezyonlar, vezikül ve papüllerle karakterizedir (Weber 2000). Enfekte sığırlarda görülen klinik belirtiler, lokal olarak boyun ve kafa bölgesinde gri veya beyaz değişiklikler ile karakterizedir. Görülen lezyonlar 10-50 mm boyutundadır. Lezyon görülen bölgede kıl dökülmesi ve kepeklenme çok fazladır. Hayvanlarda ortalama olarak 10-30 lezyon görülebilir ancak bu sayı 50 lezyona kadar çıkan hayvanlar da olabilir (Sayfarth 2011).

T. verrucosum identifikasyonu için trichophytosisli sığırların lezyonlu bölgeleri %70 alkol ile temizlenir. Daha sonra lezyonların kenar kısımlarından alınan deri kazıntıları ve kıl örnekleri Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerine ekilerek inkubasyona bırakılır. Üreyen koloniler *T. verrucosum* yönünden incelenir (Çenesiz 2007).

Zahran ve ark. (2013) *T. verrucosum* enfeksiyonuna karşı yapılan aşılama öncesi ve aşılama sonrası bağışıklık cevabının belirlenmesi için humoral immüniteyi değerlendirmek amacıyla ELISA tekniğini kullanmışlardır.

Bagut ve ark. (2013), sığırlarda mantar enfeksiyonunun serolojik tanısı için bir ELISA yöntemini geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla direkt mikroskopi, floresan mikroskopi ve PCR ile ringworm enfeksiyonu olan hayvanlarda hastalık doğrulanmış, enfekte ve sağlıklı hayvanların serum örnekleri toplanmıştır. Antijen olarak *T. verrucosum*'a filogenetik olarak oldukça yakın olan iki farklı rekombinant proteini kullanmışlardır. Sonuçlar değerlendirildiğinde genel olarak, rekombinant antijenler ile ya-

pılan ELISA'nın enfekte olmuş hayvanlar ile sağlıklı hayvanları ayırmada başarılı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar geliştirilen ELISA'nın bir antijen ile %89,6 duyarlılık, %92,7 özgüllük, diğer antijen ile %88,1 duyarlılık ve %90,9 özgüllük değerine sahip bulunduğunu bildirmişlerdir.

Zrimsek ve ark. (1999), *T. mentagrophytes* ile enfekte tavşanlar için bir indirekt ELISA geliştirmiş ve tanılabilir potansiyeli değerlendirmişlerdir.

Gudding ve ark. (1995), sığır dermatofitozisinin immunoprofilaksisini araştırmak için buzağı ve tavşanları *T. verrucosum* ile aşılamışlardır. Aşılama sonrasında hücresel yanıtı değerlendirmenin yanı sıra humoral yanıtı değerlendirmek için de ELISA ile antikor üretimini belirlemişlerdir.

Kane ve ark. (1978), *T. verrucosum*'un erken teşhisi ve tanımlanması için Trichophyton türlerini (*T. verrucosum*, *T. schoenleinii*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. megninii*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. equinum*), Brom Creosol Purple Casein Yeast extract Agara ekim yaparak 28°C'de 10 gün gözlemlemişlerdir. *T. verrucosum* ile diğer Trichophyton türlerinin karşılaştırılması sonucu *T. verrucosum*'un benzersiz sınırlı büyümesine ve geniş hidroliz zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Elad ve ark. (1995), *T. verrucosum*'a karşı aşılama sonrası buzağıkların serumlarında anti-*T. verrucosum* antikorlarının varlığını belirlemek için ELISA tekniğini başarıyla kullanmışlardır.

Mikaili ve ark. (2012), Trichophyton agarda ürettikleri *T. verrucosum* izolatını immunizasyon amaçlı 3 kere boyun bölgesinden kas içi uygulamışlardır. Bu aşıları hayvanlar ile aşısız kontrol grubu hayvanların serumlarında ELISA ile antikor titrelerini saptayarak humoral yanıtı değerlendirmişlerdir.

Bu çalışmada, trichophytosisin serolojik teşhisinde ELISA'nın kullanılabilirliği amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

İzolasyon Örnekleri: İzolasyon amacıyla Şanlıurfa ili ve çevresindeki ilçelerde bulunan işletmelerde klinik olarak trichophytosis şüpheli hayvanlarda deri lezyonları bulunan 6-12 aylık Holstein ırkı dişi hayvanlardan, lezyonlu bölgeden steriliteye uyularak deri kazıntısı ve kıl örnekleri alındı. Alınan örnekler laboratuvara getirilerek izolasyon için kullanıldı.

Pozitif Kontrol Serumları: Deri kazıntısı ve kıl örneği alınarak izolasyon yapılan kültür pozitif hayvanların bulunduğu enfekte çiftlikten 40 adet hayvandan, duyarlılığın saptanmasında pozitif referans olarak

kullanılmak üzere kan alınmıştır. Ayrılan serum örnekleri, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Negatif Kontrol Serumları: Testin özgüllüğünün ve eşik (cutoff) değerinin saptanmasında negatif referans kontrol olarak aşısız ve trichophytosis geçmişi olmayan annelerden doğan 100 adet buzağıdan doğumdan hemen sonra kan alınarak serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Test Serum Örnekleri: ELISA'da test edilmek üzere 4 işletmeden klinik olarak trichophytosis şüpheli 360 adet hayvandan kan alınarak serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

İzolasyon ve identifikasyon amacıyla, klinik olarak trichophytosis teşhisi konulan hayvanlar belirlendi. Deri kazıntıları ve kıl örnekleri alındı. Alınan deri kazıntıları ve kıl örnekleri direkt mikroskopi ve makroskopik olarak incelendi.

Direkt mikroskopi olarak; temiz bir lam üzerine Lakto fenol pamuk mavisini konulduktan sonra üzerine pens ile 5-6 kıl örneği bırakıldı ve lamelle kapatılarak mikroskop altında (200 X) incelendi. Aynı zamanda lam üzerine alınan kıl örneklerinin üzerine %10-20 KOH solüsyonu damlatılıp hafifçe ısıtıldıktan sonra 30-60 dakika beklenerek mikroskopta (200 X) incelendi (Arda 2000).

Makroskopik olarak; laboratuvara getirilen deri kazıntıları SDA besiyerine ekildi ve 20-25°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. Üreyen koloniler 3-4 günde bir gözlemlendi. İnkubasyon sonunda toplanan kültürler identifikasyon amacıyla *T. verrucosum* spesifik besiyerlerine ekimleri yapılarak 20-25°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda üreme saptanan mantar kolonilerinin; üreme hızları, morfolojileri, yüzey renkleri, tabandaki pigmentleri ve mikroskopik incelemede hiflerin yapısı, makrokonidyum ve mikrokonidyumların varlığı göz önüne alınarak identifikasyonları gerçekleştirildi (Kiraz 1988; Thomas 2018). Oluşan kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri değerlendirilerek etkenlerin identifikasyonları yapıldı (Çenesiz 2007).

***T. verrucosum* Suşunun Antijen Üretimi İçin Çoğaltılması:** İdentifikasyon ve izolasyon sonucu üreyen *T. verrucosum* kolonilerden Tiamin ve İnositol ile hazırlanmış SDA besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 20-25 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda SDA üzerinde üreyen *T. verrucosum* kültürleri steril pens ile steril şişe içine toplandı. Toplanan *T. verrucosum* kültürlerinin canlılık sayımı için dilüsyonları yapıldı (Rybníkář ve ark. 2007).

ELISA Antijenin Hazırlanması ve Belirlenmesi: ELISA için en uygun antijenin belirlenmesi amacıyla 3 farklı şekilde antijen hazırlandı.

Bu amaçla üretimi yapılan canlı *T. verrucosum* suşu 50 ml cam şişelere aktararak 3'e bölündü.

1. Antijenin hazırlanmasında üretilen *T. verrucosum* antijeni 121°C'de otoklav edildi.

2. Antijenin hazırlanmasında dondurma-çözdürme metodu kullanıldı. Bu amaçla üretilen antijen sıvı azot (-196°C) tankı içerisine 30 dakika, sonrasında oda koşullarında 30 dakika olacak şekilde 4 kere dondurulup çözdürülerek hazırlandı.

3. Antijenin hazırlanmasında dondurma-çözdürme metodu bu kez -20°C'de gerçekleştirildi. Bu yöntemde bekleme süreleri 60 dakika olarak belirlendi.

Sonuç olarak; 3 farklı şekilde hazırlanmış olan *T. verrucosum* antijenleri ile ELISA çapraz titrasyon (checkerbord) yapıldı. Bu amaçla antijenin ve serumun iki katlı dilüsyonları kullanıldı ve en uygun antijen dilüsyonu belirlendi. Belirlenen bu antijen dilüsyonunu antijenlerin ELISA pleytlerini kaplamada kullanıldı.

İndirekt ELISA: Çalışmada kullanılacak olan ELISA solid faz antijeni antijen kaplama tampon solüsyonu içinde 1/50 oranında sulandırılarak 96 gözlü tabanlı maxisorppolistiren pleytlere (NUNC 692620) 100 µl olacak şekilde taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler 4°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleytler %0,05 Tween 20 içeren phosphate buffered saline (PBS) (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Daha sonra %3 yağsız süt tozu ile hazırlanan PBS solüsyonu ile 1 saat süre ile çalkalayıcıda blokladılar. Bloklama sonrası pleytler 4 kez yıkandıktan sonra 1/100'lük dilüsyonları yapılan pozitif ve negatif kontrol serumları pleyt kuyucuklarına 100 µl olacak şekilde konuldu. Pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde inkübasyonları yapıldı. Pleytler tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini dilüsyon çözeltisinde üretici firmanın belirttiği dilüsyonda dilüe edilerek tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0,03 H₂O₂) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H₂SO₄ ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Testin eşik değerinin belirlenme-

sinde negatif absorbans değerlerinin ortalaması artı 3 standart sapma alındı. Belirlenen eşik değeri, farklı işletmelerden alınan test serumlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

Bulgular

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili ve çevresindeki ilçelerde bulunan işletmelerde klinik olarak trichophytosis tanısı konulan hayvanlardan alınan deri kazıntısı ve kıl

örnekleri ile kan serumları kullanıldı. Testin özgüllüğü ve eşik değerinin belirtilmesinde negatif referans kontrol olarak aşısız ve trichophytosis geçmişi olmayan annelerden doğan 100 adet buzağıdan alınan kan serumları kullanıldı.

Klinik Örnekler: Şanlıurfa ve çevresinde bulunan işletmelerde tespit edilen Trichophytosis'li hayvanların lezyonlu bölgelerinden yöntemine uygun olarak deri kazıntısı ve kıl örnekleri laboratuvara getirildi.

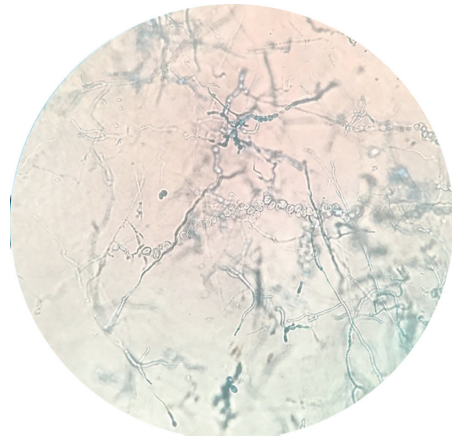


Resim 1. İşletmelerde Klinik Olarak Trichophytosis Teşhisi Konulan Hayvanlar (Fotoğraf: H. Kaplan)

Mikroskopik İnceleme: *T. verrucosum* etkeni makrokonidia ve mikrokonidilar şeklinde görüldü. Miseller renksiz, dallanmış, düz veya kıvrımlı, fare kuyruğu şeklinde gözlemlendi. Mikrokonidyumlar ise, oval, yuvarlak veya armut biçiminde olduğu görüldü.

Makroskopik İnceleme: Oluşan koloni rengi, yapısı, alt ve üst yüzey rengi dikkatlice incelendi, mantar atlasında bulunan bilgilerle karşılaştırıldı ve uygunluğu ispat edildi.

ELISA Antijenin Belirlenmesi: Hazırlanan 3 farklı antijenin çapraz titrasyon sonuçları birbirine benzer sonuçlar verdiği için güvenlik nedeni ile canlı olmayan otoklav edilen suş (1.antijen) ELISA solid faz antijeni olarak seçildi.



Resim 2. Mikroskopta (X1000) *T. verrucosum* Etkeni Mikrokonidilar ve Makrokonidialar (Fotoğraf: H. Kaplan)

Serum Örnekleri: Şanlıurfa ili ve çevresinde bulunan işletmelerde (A, B, C, D) klinik olarak tespit edilen; trichophytosisli ve sağlıklı hayvanlardan temin edildi. Hayvanlardan kan örnekleri alınarak serumlar çıkarıldı ve bu serumlar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

Eşik Değerinin Hesaplanması: Çalışmada negatif kontrol serumlarının OD değerlerinin ortalaması artı 3 standart sapma ELISA için eşik değeri olarak hesaplandı. Hesaplanan bu değer test edilen serumların sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

Çalışmada pozitif referans olarak kullanılan 40 pozitif serumun 38'i belirlenen eşik değeri dikkate alınarak ELISA ile pozitif olarak bulundu. Testin ta-

nısal duyarlılığı (Gerçek pozitif sayısı/Gerçek pozitif sayısı + Yanlış negatif sayısı)x100 formülü ile hesaplandı ve duyarlılık (sensitivite)= %95,24 olarak bulundu.

Çalışmada negatif referans olarak kullanılan 100 serumun hiçbirisi eşik değeri üzerinde OD değeri vermedi. Testin tanısız özgüllüğü (Gerçek negatif sayısı/Gerçek negatif sayısı + Yanlış pozitif sayısı) x100 formülü ile hesaplandı ve özgüllük (spesifite)= %100 olarak belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre test edilen 360 adet serumdan 289 (%80,3) adedi pozitif, 71 (%19,7) adedi ise negatif olarak değerlendirildi (Tablo 1).

Tablo 1. ELISA Sonuçlarının İşletmelere Göre Dağılımı

İşletme adı	A	B	C	D	Toplam
Pozitif serum sayısı ve % oranı	71 %78,9	76 %82,6	84 %95,45	58 %64,44	289 %80,3
Negatif Serum sayısı ve % oranı	19 %21,1	16 %17,4	4 %4,54	32 %35,55	71 %19,7
Toplam Serum Sayısı	90	92	88	90	360

Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda ringworm olarak bilinen dermatofitozisin en yaygın olarak görülen etkeni zoofilik bir dermatofit olan *T. verrucosum*'dur. *T. verrucosum*'un buzağılarda en önemli morbidite faktörlerinden biri olduğu bildirilmiş olmasının yanı sıra, koyun, keçi ve atlarda da enfeksiyon oluşturur. Sığırlardaki trichophytosis aynı zamanda insanlara zoonotik geçişi nedeniyle önem taşır. Bugüne kadar, sığırlarda trichophytosisse karşı immün yanıtın değerlendirilmesine yönelik az sayıda çalışma yapılmıştır. Deneysel enfeksiyonlar veya aşılama çalışmalarından sonra hem humoral, hem de hücreyel yanıtı değerlendiren birkaç çalışma bulunmaktadır. Dermatofitozis olgularında vücutta antikor yanıtının gelişimi, hastalığın tanısında serolojik teşhisi kullanma imkân sağlar. Ulaşılabilen literatür verilerine göre, hayvanlarda dermatofitozis olgularında antikor yanıtlarının değerlendirilmesi için ELISA teknikleri geliştirilmiştir, ancak sığırlarda *T. verrucosum* tanısı amacıyla spesifik antikorların saptanmasına yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır. (Bagut ve ark. (2013))

Zrimsek ve ark. (2002), *Trichophyton mentagrophytes* ile enfekte tavşanlarda tanısız potansiyelini değerlendirmek amacıyla bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar *T. mentagrophytes* ile enfekte olmuş tavşanlarda ELISA ile humoral yanıtın değerlendirilmesinin, standart yöntemlerden daha

erken ve daha uygun bir dermatofitoz teşhisine katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Zrimsek ve Drobic-Kosorok (2002), kedilerde ve tavşanlarda *Microsporum canis* ve *T. mentagrophytes*'e karşı oluşan spesifik IgG yanıtının saptanması için iki indirekt ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Bu amaçla enfekte 20 kedi ve 25 tavşana ait serum örneğini test etmişlerdir. Araştırmacılar tavşanlarda ELISA ile mevcut klasik teşhis yöntemlerine göre daha erken ve uygun teşhis sağladığını, kedilerde spesifik antikorların saptanması ile de doğru tedaviye çok erken başlamanın mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Brouta ve ark. (2003), *M. canis* majör fungal antijenlerini saptamaya yönelik olarak çalışmada ELISA ile humoral yanıtı ölçmüşler ve antijenleri başarı ile tespit etmişlerdir.

Peano ve ark. (2005), köpeklerde *M. canis* tarafından oluşturulan dermatofitozislerin teşhisi için geliştirdikleri ELISA'nın duyarlılığını %83,3, özgüllüğünü %95,2 olarak bildirmişler ve testin duyarlılığının direkt mikroskopi ve kültür tekniklerinden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Zahran ve Abdeen (2013), hazırladıkları *T. verrucosum* aşısının tavşanlarda deneysel olarak araştırılması için humoral immün yanıtı değerlendirmek için ELISA'dan yararlanmışlardır.

Santana ve ark. (2018), semptomatik ve asemptomatik dermatofitozisli kedilerde serolojik tanı için bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri testin duyarlılığını %94 bulurken özgüllüğü %75 olarak hesaplamışlardır.

Elad ve Segal (1995), yapmış oldukları aşılama çalışmasında oluşan humoral yanıtın değerlendirilmesi için ELISA tekniğini kullanmışlar ve aşılama ile hücrel immun yanıt yanında humoral yanıtın da uyarıldığını bildirmişlerdir.

Mikaili ve ark. (2012), sığırlarda canlı *T. verrucosum* ile immunizasyon sonucunda oluşan antikorların saptanması amacıyla ELISA tekniği kullanmışlar ve immunizasyon yapılan hayvanların serum OD değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bagut ve ark. (2013), sığırlarda *T. verrucosum* tarafından oluşturulan dermatofitozislerin teşhisi amacıyla bir ELISA tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmacılar bu amaçla *T. verrucosum*'a %98 yapısal benzerlik gösteren *Trichophyton rubrum*'a ait iki rekombinant antijen kullanmışlardır. Trichophytosisli olduklarını direkt mikroskopi, floresan mikroskopi ve Polymerase Chain Reaction (PCR) ile doğruladıkları 135 sığırdan aldıkları serum örnekleri ile hastalık geçmişi bulunmayan ve herhangi bir deri lezyonu taşımayan 55 sığır serumunu kontrol serumu olarak kullanmışlardır. Kullanmış oldukları bir antijenle yapılan ELISA'nın duyarlılığını %89,6, özgüllüğünü %92,7 bulurken, ikinci antijen için özgüllük %96,8, özgüllük %78,4 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçlara göre geliştirdikleri ELISA tekniğinin epidemiyolojik çalışmalarda, aşılama veya aşılama yöntemlerinin sonuçlarını değerlendirmede kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada otoklavlanmış etken ile hazırlanmış antijen ile yapılan ELISA'da duyarlılık %95,24, özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar araştırmacıların bildirdiği oranlara kısmen yakın olsa da özellikle özgüllük belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Bunun da negatif kontrol serumu olarak kullanılan serum örneklerinden veya antijenin faklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda iklim, mevsim, yaş gibi faktörlere bağlı olarak çiftlikten çiftliğe değişiklik göstermekle beraber çiftliklerde trichophytosis prevalansı araştırmacılar tarafından %10-100 arasında bildirilmektedir (Papini ve ark. 2009). Bu çalışmada işletmelere göre pozitiflik oranı %58-84 arasında saptanırken genel olarak incelen 360 adet serumdan 289 (%80,3) adedi pozitif, 71 (%19,7) adedi ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitiflik oranının yüksek seviyelerde ol-

masının nedeni incelenen serum örneklerinin etken izolasyonu yapılarak trichophytosis olduğu doğrulanan sürülerden toplanmış olması, hayvanların bir yaştan altıda olması ve bölge ikliminin hastalık çıkışına yatkın olması gibi etkenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sığırlarda trichophytosisin serolojik teşhisi için bir ELISA geliştirmenin amaçlandığı bu çalışmada duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek seviyede bir ELISA tekniği oluşturulmuştur. Geliştirilen bu ELISA ile hastalıklı sürülerden alınan serumların incelenmesi ile işletmelerde trichophytosis pozitifliğinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Trichophytosis sürülerde yaygın olarak bulunduğu sürü performansını düşürmekte, tedavi ve deri hasarları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açmakta, ancak buzağılarda ölümler de oluşturabilmektedir. Bu nedenle gerek şüpheli durumlarda hastaların tespiti gerekse epidemiyolojik çalışmalar amacıyla ELISA ile seropozitifliğin saptanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca etkenin zoonoz özelliği de göz önüne alınırsa, sürü ile bağlantılı kişiler için bir risk taşıyan hasta hayvanların erken teşhisi ve tedavisi gerek hayvan sağlığı gerekse insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Erken tedavi ile hastalığın neden olduğu yanlış tedavi giderleri, performans kayıpları gibi ekonomik kayıplara yol açan birçok faktör de etkisiz hale getirilebilecektir.

Etik Kurulu Kararı: Dollvet A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DOLLVET-HADYEK) 23.11.2016 tarih ve 2016/35 Karar No'lu Etik Kurulu Kararı

Teşekkürler: Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17055 proje numarası ile desteklenmiştir.

Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi: Yazarların maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ile herhangi bir çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- Arda M. (2000) *Temel Mikrobiyoloji*. 2. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi, s.315-367.
- Bagut ET, Cambier L, Heinen MP, Cozma V, Monod M, Mignon B. (2013) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Ringworm Infection in Cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 20(8), 1150-1154.
- Biberstein EL, Hirsh DC. (2004) Dermatophytes. Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL, eds. *Veterinary Microbiology*. Blackwell Publishing Co, Oxford. pp.273-284.
- Brouta F, Descamps F, Vermout S, Monodi M, Lossou B. (2003) Humoral and cellular immune response to a *Microsporium canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol.* 41, 495-501.

- Carlsson J. (1993) Risken for ringworm hos notkreatur och miiniska. *Sven Vet Tidn.* 45, 467-471.
- Çenesiz S, Cevat N, Yarım GF, Arslan HH, Çiftçi A. (2007) Trikofitozisli ineklerde serum adenoazin deaminaz aktivitesi (ADA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 54, 155-158.
- Davidov I, Radinovic M, Kovacevic Z, Erdeljan M, Galfi A, Ilić S. (2018) Trichophytosis in Beef Cattle. *VJRS.* 18(2), 428-445.
- Deacon JW. (1988) *Introduction to modern mycology.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp.1-239.
- Elad D, Segal E. (1995) Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *J Vacc.* 13(1), 83-87.
- Gudding R, Lund A. (1995) Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can Vet J.* 36, 302-306.
- Haab C. (1991) *Epidemiologie der Trichophytie beim Mastkalb* (Inaugural Dissertation). Switzerland, Zurich: University of Zurich. p.77.
- Kane J, Smitka C. (1978) Early Detection and Identification of *Trichophyton verrucosum*. *J Clin Microbiol.* 8(6), 740-747.
- Kiraz M. (1988) Dermatofitlerin tür tanısı ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Doktora tezi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Mikaili A, Chabili M, Ghashghaie A, Mostafaie A. (2012) Immunization against bovine dermatophytosis with live *Trichophyton verrucosum*. *Afr J Microbiol Res.* 6(23), 4950-4953.
- Morrell J, Stratman E. (2011) Primary Care and Specialty Care Delays in Diagnosing Infection Related to Cattle Exposure. *J Agromedicine.* 16(4), 244-250.
- Papini R, Nadoni S, Fanelli A, Mancianti F. (2009) High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses Public Health.* 56(2), 59-64.
- Peano A, Rambozzi L, Gallo MG. (2005) Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the serodiagnosis of canine dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. *Vet Dermatol.* 16, 102-107.
- Rybníkář A, Oborilova E. (2007) Clinical assessment of postinfection, postcontact and postvaccination immunity manifestation after experimental inoculation of calves with *Trichophyton verrucosum* culture. *Mycoses.* 51, 236-242.
- Santana AE, Taborda CP, Severo JS, Rittner GMG, Munoz JE, Larsson Jr CE. (2018) Development of enzyme immunoassays (ELISA and Western blot) for the serological diagnosis of dermatophytosis in symptomatic and asymptomatic cats. *Med Mycol.* 56, 95-102.
- Sayfarth F, Roediger C, Graser Y, Erhard M, Burmester A, Elsner P. (2011) Case report: *Trichophyton verrucosum* infection after needlestick injury with an attenuated live vaccine against cattle ringworm. *Mycoses.* 54(6), 870-876.
- Simpanya MF. (2000) Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. Kushwaha RKS and Guarro J. eds. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi.* Rev Iberoam Micol. Bilbao. pp.1-12.
- Tel OY. (2005). Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Thomas JW, Hayden RT, Larone DH. (2018) *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification.* 6th edition. ASM Press, USA. pp.270-280.
- Weber A. (2000) Mycozoonoses with special regard to ringworm of cattle. *Mycoses.* 43(1), 20-22.
- Zahrn RN, Eman AA. (2013) Evaluation of the Immune Response to *T. verrucosum* Vaccines. *Am J Immunol.* 9 (4), 139-147.
- Zrimsek P, Drobnic-Kosorok M. (2002) Diagnostic Value of ELISA Tests for the Detection of Specific Antibodies in Cats and Rabbits with Dermatophytosis. *J Biotechnol.* 40(3), 171-175.
- Zrimsek P, Kos J, Pinter L, Drobnic-Kosorok M. (1999) Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. *Vet Microbiol.* 70(1-2), 77-86.



Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri ve Kırıkkale illerinde bulunan broiler işletmelerinin büyüklüğü ve hayvan besleme alışkanlıkları

Mustafa Coşar¹ , M. Akif Karslı²

¹ Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

² Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Kırıkkale

Geliş Tarihi / Received: 17.09.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 09.12.2020

Özet: Tez çalışması kapsamında toplam 42 adet entegre broiler işletmeciliği yapan çiftlik ziyaret edilerek yüz yüze anket uygulanmıştır. Entegre broiler işletmelerinin mevcut durumları hakkındaki bilgiler değerlendirmeye alınmıştır. İşletmelerin %64,3'ünün şirket ve %35,7'sinin aile tipi olduğu görülmüştür. İşletmelerin %16,7'si 10.000'den az, %38,1'i 10.000 ile 30.000 arası, %16,7'si 30.000 ile 50.000 arası, %9,5'i 50.000 ile 100.000 arası ve %19'u 100.000 ve üzeri baş barındırma kapasite ve büyüklüğe sahiptir. İncelenen bütün kümeslerde kullanılan canlı hayvan materyalinin ithal hibrit ırklardan olup, bir dönemdeki ölüm oranları genelde yaklaşık %3- 4 civarındadır. Kümeste m²'ye konulan hayvan sayısı 20-25 adet (%52,4) ve 16-19 adet (%47,6), besleme periyodu boyunca hayvan başına tüketilen yem genelde 3,6-4,2 kg ve 45 günlük canlı ağırlık ortalaması 1,9- 2,3 kg arasındadır. Yalnızca 3 işletme yemini kendisi üretmektedir. Altı işletme yemi dışarıdan satın almakta ve 33 işletmede ise sözleşmeli üretim yapılmaktadır. İşletmelerin %95,28'inde yemler hayvanlara otomasyon sistemi ile verilmektedir. Besi performansı göstergeleri, işletmelerin tamamında besi sonu canlı ağırlık (BSCA) ve yemden yararlanma oranı (FCR)'dir. Et materyalinin pazarlanması ise, işletmelerin %92,85'i entegre tesisleriyle anlaşmalı satış yapmaktadırlar. İşletmelerin tamamında yıllık 4 ile 6 dönemde hayvanlar kesime sevk edilmektedir. Ziyaret edilen tüm illerdeki işletmelerin en önemli sorununun yem maliyeti, girdi fiyatları, ürün fiyatında yıl boyu dalgalanma ve fiyat istikrarsızlığı olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak, araştırma yapılan illerin broiler işletmelerinin genel durumuna bakıldığında işletmelerin giderek büyüdüğü, işletme sahiplerinin eğitim düzeylerinde iyileşme olduğu ve buna bağlı olarak bilgi ve teknolojiyi kullanım eğilimlerinin geliştiği, hayvan barınak durumlarının genel olarak iyi durumda olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Broiler, işletme, kümesler, ticari, yetiştiricilik.

The scales and feeding practices of broiler operations located at Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri and Kırıkkale provinces

Abstract: A total of 42 integrated poultry (Broiler) farms were visited and surveys were administered to the owners at the aim of thesis work. Information about existing situation of integrated broiler farms was evaluated. Approximately 64,3% of enterprises were companies and 35,7% of them were family type farms. The numbers of broiler that enterprises have were less than 10,000 (16,7%), between 10,000 and 30,000 (38,1%), between 30,000 and 50,000 (16,7%), between 50,000 and 100,000 (19%) with 100,000 and above (9,5%). Broiler houses visited were mostly used hybrid chicks of foreign origin and in general, mortality was around 3- 4% for each period. The stocking density of broilers were 20-25 birds/square meter (52.4%) and 16-19 birds/square meter (47.6%), during a fattening period, the amount of feed intake for a broiler were 3,6-4,2 kg in general and the average live weight was 1,9-2,3 kg at 45 days of age. Only 3 of enterprises produce feed themselves among enterprises studied. Six operations buy feed from the outside (feed-milling companies) and thirty-three of them work based on the contract with manufacturing business. At 95,28% of the farms, animals were fed with the automated system. Fattening performance criteria were live weight at the end of fattening period and feed conversion ratio (FCR) at all of the farms visited. Marketing of meat material was based on the contract with integrated facilities at 92,85% of enterprises. All of the enterprises have between 4 to 6 production cycle per year. It was noted that the most important problem of all the farms at different provinces visited were feed cost, cost of input, fluctuation at product prices throughout the year and price instability. In conclusion, when it is looked at the overall state of enterprises, the broiler enterprises at provinces evaluated are growing steadily, education levels of business owners is improving and therefore, the use of information and technology trends is improving, the current condition of animal shelter is generally in good condition.

Keywords: Breeding, broiler, commercial, enterprise, poultry house.

*Bu çalışma K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesindeki birinci yazarın Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Mustafa COŞAR, Etlık VKMAE Müdürlüğü Genetik Laboratuvarı Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No:21-21 A, K.Ören/ ANKARA E-posta: mustafacosar1@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-9274-3826 • ²0000-0002-3081-9450

Giriş

Ülkemiz hayvancılığının sürdürülebilirliğinin sağlanması sadece işletme sayısı ve büyüklüklerinin artırılması ile değil, yönetimin iyi olması ve hayvan besleme konusunda bilimsel ve teknik bilgilere dikkat edilmesi ile gerçekleştirilebilir. Hayvancılık işletmeleri günümüzde genel olarak yüksek verimli ırklarla çalışılmasından dolayı amatör yetiştiriciliğin dışına çıkılarak profesyonelleşmiştir. İşletme karlılığını en çok etkileyen girdi yem tedarikidir. İşletme giderlerinin %70'ni hayvan besleme giderleri oluşturmaktadır (Ergün ve ark 2002). Hayvanların yeterli ve dengeli beslenmesi işletme karlılığı açısından önemlidir. Bu konunun iyi yönetilmesi sürdürülebilirliğin temel şartıdır.

Ülkemizin nüfusu hızla artmaktadır. Doğal kaynaklarımız ise artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle düzenli ve dengeli beslenme bir problem olmaya başlamıştır. Düzenli ve dengeli beslenmenin temelini biyolojik değeri yüksek olan besin maddelerinin yeterli ve dengeli alınması oluşturur. Bitkisel proteinlerin biyolojik değeri düşük olup, hayvansal proteinlerin biyolojik değeri yüksek ise daha yüksektir. Bu sebeple yeterli ve dengeli beslenmek için hayvansal ürünler ile beslenmek şarttır. Yumurta, et, süt ve balık biyolojik değeri yüksek olan hayvansal ürünlerdir. Hayvansal protein ihtiyacını karşılamada tavuk eti önemli bir role sahiptir. Tavuk eti protein, enerji, vitamin ve mineraller bakımından zengindir. Sindirimi kolaydır. Tüketime kolay ve değişik şekillerde sunulduğu için tavuk etine olan talep giderek artmaktadır. Kanatlı hayvan türleri genel olarak hızlı büyümektedir. Kuşaklar arası süre kısadır. Üreme gücü yüksek olan hayvanlardır. Bu nedenle beslenmeleri diğer türlere göre daha kolay ve ucuzdur. Bu da tavukçuluk için bir avantaj sağlamıştır (Yüzbaşı 2002).

Tavuk ürünleri halkımızın protein ihtiyacını sağlamada, diğer hayvansal üretimlerden daha fazla rağbet görmektedirler. Bu nedenle kırmızı ete bir alternatiftir. Bunun nedeni ise tavuğun yemi ete ve yumurtaya dönüştürme kabiliyetinin yüksek olmasıdır. Bunun yanında piliç etinin diğer etlere göre fiyatının çok ucuz oluşu da önemlidir. Ayrıca tavuk etinin az yağlı olması, çabuk pişmesi ve servise hazır olması diğer üstünlükleridir. Şüphesiz ki hayvansal üretim içinde tavukçuluk, hayvansal proteini en kolay ve ucuza sağlayabilecek bir özelliğe sahiptir. Broilerler 1 kg hayvansal protein için 21,5 kg yem tüketirken, sığırlar 101 kg yem, domuzlar 69 kg yem, hindiler 22,2 kg yem ve yumurta tavuğu ise 20 kg yem tüketirler. Buradan da anlaşılacağı üzere beslenmede

tavuk eti ve yumurta kolay ve ucuz bir protein kaynağıdır (Türkoğlu 1997; Yenilmez 2005). Hayvansal protein tüketimi beden ve zihin gelişiminde insan sağlığı için çok önemlidir. Tüketim toplumlarında kırmızı ete talep artmıştır. Ancak talepler yeteri kadar karşılanamamaktadır. Oysa ülkemizde halkımızın et ihtiyacı tavukçuluk sayesinde karşılanabilmektedir. Ülkemizde tavukçuluk, hızlı gelişmekte ve en son teknolojiyi uygulamakta olup, üretimden pazara kadar entegrasyonu sağlayan dev entegre tesislere sahiptir (Anonim 2004). Bu entegre yapı ve modern tesisler üretimden pazara kadar sözleşmeli üretimin önünü açarak tavukçuluğu cazip hale getirmiştir. Bu haliyle de ülkemizde hayvancılığın diğer dallarına örnek oluşturmuştur. Bu sayede üretici firmalar, üretimden pazarlamaya kadar tüm süreçleri kendileri kontrol etmektedirler. Böylece verimli faaliyetlerine sürdürülebilir bir şekilde devam etmektedirler (Şahan ve ark 1998; Yenilmez 2005). Ancak, sektörün genel durumunu analiz eden, bilimsel çalışma çok fazla bulunmamaktadır. Bu çalışmada ülkemizin önemli illerinde (Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri ve Kırıkkale) yer alan entegre broiler işletmelerinin hayvan besleme ve barınaklar açısından genel durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma birinci yazarın Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde yaptığı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Ülkemizin farklı beş ilinde, broiler sayısı 9.012.522 adet olan Ankara'da 11, broiler sayısı 31.782.927 adet olan Bolu'da 13, broiler sayısı 2.662.000 adet olan Eskişehir'de 9, broiler sayısı olan 55.000 adet olan Kayseri'de 4 ve broiler sayısı 70.000 adet olan Kırıkkale'de 5 işletme olmak üzere toplam 42 adet broiler işletmeciliği yapan çiftlik ziyaret edilmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu 2017). Araştırmanın materyalini işletme sahipleri veya sorumlu kişileriyle yüz yüze yapılan anket yöntemiyle elde edilen veriler oluşturmaktadır. Tesadüfî örnekleme yöntemi kullanılarak işletmeler seçilmiştir. Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Besleme Hastalıkları ABD ile Zootehni ABD öğretim üyelerince hazırlanan anket formu broiler yetiştiriciliği yapan bu çiftliklere uygulanmıştır. Anket formu biri açık uçlu olmak üzere toplam 37 soru içermiştir. Anket soruları, işletmede çalışanların sayısını ve cinsiyetini, işletme sahibinin eğitim durumunu, işletmenin finansman kaynağı, işletme büyüklüğü, şirket şekli, barınakların durumu, girdi temini durumu, hayvan ve yem temini, yemleme şekli, kullanılan teknikler, birliklerle ilişkiler, besi performansı ve pazarlama

durumu, tarımsal destek ve teşviklerden yararlanma durumu ve en sıklıkla rastlanan sorunlar gibi birçok konuyu kapsayacak şekilde hazırlanmıştır. Anket sorularının anlaşılır ve cevaplarının net olmasına özen gösterilmiştir. Tespit edilen bulguların tanımlayıcı istatistikleri, frekansları ve yüzde dağılımları hesaplanmıştır. Microsoft Office 2010 Excel ve SPSS for Windows (16.0) programları kullanılarak, verilerin elektronik ortama girilmesi ve hesaplanmaları sağlanmıştır. Elde edilen veriler oransal olarak tablo halinde çalışmada yer almıştır.

Bulgular

Çalışmada elde edilen anket verilerinden ticari entegre broiler işletmelerinin durumu tablo 1'de verilmiştir. İşletmede çalışan sayısı %33,33'ünde 1-2 kişi, %40,47'sinde 3-5 kişi, %21,43'ünde 6-10 kişi ve %4,76'ında ise 10 ve üzeri (kişi) çalışan bulunmaktadır. Çalışmanın yapıldığı illere göre farklılık göstermek üzere, 1-2 kişi çalışanların %50-75'nin erkek, %25-50'sinin kadın, 3-5 kişi çalışanların %66,66-80'inin erkek, %20-33,33'ün kadın, 6-10 kişi çalışanların %66,66-80,76'sının erkek, %19,23-33,33'ünün kadın, 10 ve üzeri kişi çalışanların ise %80-83,33'ünün erkek, %16,66-20'sinin de kadın personel olduğu tespit edilmiştir. İşletmedeki çalışanların %9,52'si 40 yaşın üstünde, %47,62'si 40 yaşın altında ve %42,85'nin ise yaşları 40 yaşın hem altında hem de üstündedir. İşletme sahiplerinin %26,19'u ortaokul, %59,52'si lise ve %14,29'u ise üniversite mezunu olduğu belirmiştir. İşletmelerin %85,71'inin çiftlik dışında başka bir işle de uğraştığı, %14,29'unun ise sadece çiftlik ile uğraştığı görülmektedir. İşletmelerin tipi, büyüklüğü, kümes sayısı, kapasitesi ve yaşı tablo 2'de verilmiştir. İşletmelerin %35,71'inin aile tipi ve %64,29'unun ise şirket olduğu görülmektedir. İşletme büyüklüklerinin %16,67'sinin 10 bin altı olduğu, %38,10'unun 10-30 bin arası olduğu, %16,67'sinin 30-50 bin arası olduğu, %9,52'sinin 50-100 bin arası olduğu ve %19,05'inin ise 100 bin ve üzeri olduğu görülmektedir. Her işletmedeki kümes sayısı, kümesin kapasitesi ve kümesin doluluk oranı farklıdır. Kümes sayısı ve kapasitesinin yüksek olduğu entegre işletmelerde bu durumun üretime olumlu olarak yansıdığı görülmektedir. Ayrıca üretim, illerin ve bölgelerin gelişmişlik düzeyine, işletmelerin entegre durumuna göre değişkenlik arz etmektedir. İşletmelerin %38,10'unda 2 kümes, %19,05'in 3 kümes, %14,29'unda 4 kümes, %4,76'sında 5 kümes, %14,29'unda 6 kümes, %4,76'sında 8 kümes ve %4,76'sında ise 10 kümes olduğu görülmektedir. İşletmelerin %2,38'inde kümesin yaşı 5-10 yıl arası olup, %97,62'inde ise 10 yaş ve üzeri olduğu görül-

mektedir. Tablo 3'teki işletmelerin hayvan ve yem temini, civciv durumuna göre, işletmelerin %57,14'ünün öz sermaye kullandığı, %42,86'sının ise hem öz sermaye hem de kredi ve teşvik kullandığı görülmektedir. İşletmelerin %14,29'unun hayvan ve yem teminini yurt içi sertifikalı işletmelerden sağladığı, %7,14'ünün işletme içinden temin ettiği ve %78,58'inin ise sözleşmeli üretim yaptığı anlaşılmaktadır. İşletmelerdeki civcivlerin %7,14'ünün 16 günlük, %4,76'sının 17 günlük, %28,57'sinin 18 günlük, %7,14'ünün 19 günlük, %28,57'sinin 20 günlük, %2,38'inin 21 günlük, %11,90'ının 22 günlük, %2,38'inin 24 günlük ve %7,14'ünün ise 25 günlük olduğu görülmektedir. İşletmelerin %78,57'sinin sözleşmeli olarak üretim yaptığı, yemin satın alındığı veya işletme içinde kendilerinin ürettiği işletmelerde ise bir civcivin yem maliyetinin %2,38'inin 1,25 TL, %2,38'inin 1,3 TL, %4,76'sının 1,35 TL, %9,52'sinin 1,4 TL ve %2,38'inin ise 1,45 TL olduğu görülmektedir. İşletmelerin besi süresi, yem temini, yem hazırlama ve yemleme tipi tablo 4'te verilmiştir. İşletmelerdeki besi süresinin %9,52'sinin 40 gün, %90,48'inin ise 45 gün olduğu görülmektedir. İşletmelerde FCR'nin %2,38'inin 1,75'in altında ve %97,62'sinin ise 1,75-1,90 arasında olduğu görülmektedir. İşletmelerde kesif yem temini, %7,14'ünde kendi üretimi şeklinde, %14,29'unda tamamen dışarıdan satın alındığı ve %78,57'sinde ise yem temini sözleşmeli üretim şeklinde olduğu görülmektedir. İşletmelerde yemin verilmiş şekli, %95,24'ünde otomasyon sistemi ile, %4,76'sında ise yarı insan gücü ile olduğu görülmektedir. İşletmelerde yemin hazırlanması ve yemle ilgili teknik destek durumu ise %52,38'inde danışman aracılığı ile, %47,62'inde de sözleşmeli üretim olduğu için, üretimi yaptıran firmanın sağladığı görülmektedir. İşletmelerde antibiyotik kullanılmadığı, ancak yem katkı maddesi olarak vitamin, mineral madde, probiyotik ve prebiyotik kullanıldığı anlaşılmaktadır. İşletmelerde kullanılan su, kümeslerin dezenfeksiyonu, ekipman-işçi kullanımı ve veteriner hekimlik hizmet durumu tablo 5'te verilmiş olup, işletmelerde %76,19'unun şebeke suyu kullandığı, %23,81'inin ise kuyu suyu kullandığı görülmektedir. Her partiden önce bu işletmelerin tamamında kümeslerin dezenfekte edildiği belirtilmektedir. İşletmelerin %45,24'ünde her kümesin işçi ve ekipmanın ayrı, %54,76'sında ise ekipman ayrı ancak işçilerin aynı olduğu görülmektedir. Bu işletmelerin tamamında aşılama düzenli yapıldığı belirtilmektedir. İşletmelerin veteriner hekim hizmetlerini, %2,38'inde çiftlik veteriner hekiminin, %19,05'inde özel kliniklerin ve %78,57'inde ise sözleşmeli üretim olduğu için, üretimi yaptıran firmanın veteriner hekimlerinin sağladığı görülmektedir. İşletmelerde besi performansı

göstergeleri ve et materyalinin pazarlanması durumu tablo 6'da verilmiştir. İşletmelerin %2,38'inde kesimhanede kestirip satış şeklinde, %4,76'unda kendi işletmesinde değerlendirme şeklinde (market, et deposu vs) ve %92,86'sında ise entegre tesisleriyle anlaşmalı satış şeklinde olduğu görülmektedir. Araştırma yapılan 42 adet işletmelerin hiç birinde ihbarı mecburi ve önemli kanatlı hayvan hastalıklarına rastlanılmamıştır. Bu da işletmelerimizin bu hastalıklardan ari olduğunu göstermektedir. Tablo 7'deki işletmelerin yıllık kesim sayısı, toplam kesilen hayvan sayıları, yıllık ölüm oranı, gübrenin kullanım ve örgütlenme durumuna (kooperatif, birlik vs üyelik) göre ise işletmelerdeki yıllık kesim sayısı 4-6 arasındadır. İşletmelerin %14,29'unda 50 bin altı, %35,71'inde 50-150 bin arası, %16,67'sinde 150-250 bin arası, %26,19'unda 250 bin-1 milyon arası ve %7,14'ünde ise 1 milyon üzeri kesim yapıldığı görülmektedir. 42 adet entegre işletmede, bir devirde kesilen hayvan sayısı ortalama 45-50 bin civarındadır. Entegre işletmelerde kümes sayının, kümes kapasitesinin ve yıllık devir sayısının artmasına bağlı olarak yıllık kesilen hayvan sayısı da artmaktadır. İşletmelerdeki yıllık ölüm oranı %3-4 'tür. İşletmelerin %78,57'sinde elde edilen gübre (taşıma esnasında çevreye zarar vermemek üzere sızdırmaz kapalı araçlarla dikkat bir şekilde taşınarak) çiftlik dışı kendi tarım arazisinde kullanıldığı, %21,43'ünde ise elde edilen gübrenin imha edildiği görülmektedir. Tüm işletmelerde ise izole edilmiş gübrelikler mevcuttur. İşletmelerin örgütlü olduğu görülmüştür. İşletmelerdeki tarımsal destek durumu (arazi, hayvan, yem bitkisi vs), hayvancılık faaliyetlerinden memnuniyet durumu ve gelecek planı tablo 8'de verilmiştir. İşletmelerin %52,38'inin tarımsal destek durumundan (arazi, hayvan, yem bitkisi vs) yararlandığı, %47,62'sinin ise bu desteklerden yararlanmadığı belirtilmektedir. İşletmelerin %80,95'inin *"Memnunum ve yapmaya devam etmeyi planlıyorum."* dediği, %7,14'ünün *"Memnunum ve yapmaya devam etmeyi planlamıyorum."* dediği, %11,90'ının *"Memnun değilim ve yapmaya devam etmeyi planlıyorum."* ve *"Memnun değilim yapmaya devam etmeyi planlamıyorum."* diyenlerin ise %0 olduğu görülmektedir. Büyük bir çoğunluğunun hayvancılık faaliyetinden memnun olduğu ve devam edeceği anlaşılmaktadır. Araştırmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmesinin

sorunlarını genel olarak değerlendirdiğimizde 26 adet ortak sorun olduğunu tablo 9'da görmekteyiz. İşletmelerin en önemli sorununun yem hammaddesi ve girdi fiyatlarının yüksek oluşu (%12,38) ifade edilmiştir. Bu nedenle, yem ve girdi maliyetlerinin karlılık açısından son derece önemli olduğu bilinmelidir. İkinci en önemli sorunun finansman ve kredi sorunu (%10,95) olduğu ifade edilmiştir. Üçüncü sırada barınak- ekipman sorunu (%8,01) olduğu belirtilmiştir. Dördüncü ürünün fiyatında yıl boyu dalgalanma ve fiyat istikrarsızlığı (%7,62), beşinci teknik bilgi yetersizliği (%7,62), altıncı teknik ve nitelikli eleman yetersizliği (%7,14), yedinci ulaşım ve nakliye sorunu (%6,66), sekizinci altyapı sorunu (%5,23), dokuzuncu hayvan temininde güçlükler (%5,23), onuncu hastalıktan korunma ve aşılama güçlüğü (%5,23), onbirinci FCR hedefini yakalayamama endişesi- zarar etme korkusu, verim düşüklüğü (%4,76) ve onikinci ekonomik kriz ve problemler (%2,85) şeklinde sıralanırken kalan diğer 14 madde toplamı da sorunun %12,34'ünü oluşturmaktadır. Tablo 10'daki hayvan barınaklarının durumu ise, işletmelerin tamamında işletme türü olarak kapalı sistem uygulanmaktadır. İşletme tipi olarak yerde yetiştirme yapılmaktadır. Bütün kümeslerin havalandırması ise otomasyon sistemi zorlamalı havalandırma (fanlar sayesinde) yapılmaktadır. İşletmelerin %30,95'inde aydınlatma durumları (pencere tipi ve alanı)'nın yeterli olduğu, %60,05'inde ise yetersiz olduğu görülmektedir. Yemlik tipi, adedi ve boyutları yeterlidir. Suluk tipi asma suluk tipi olup, adedi ve büyüklükleri yeterlidir. İşletmelerin %40,48'inde altlık temizliğinin otomatik sıyrıcıyla yapıldığı ve %59,52'sinde ise traktörle mekanik olarak yapıldığı görülmektedir.

Bu bilgiler ışığında araştırma yapılan illerin entegre broiler işletmelerinin genel durumuna baktığımızda işletmelerin giderek büyüdüğü, işletme sahiplerinin eğitim düzeylerinde iyileşme olduğu ve buna bağlı olarak bilgi ve teknolojiyi kullanım eğilimlerinin geliştiği, hayvan barınak durumlarının da iyi durumda olduğu görülmektedir. Çalışmamızdaki beş ile ait işletmelerin toplam durumunu detaylı gösteren ve aşağıda sunulan anket veri tabloları, yayınlanacak dergide araştırma makalesinin sayfa sayısının sınırlı olması ve tabloların hacminin dergi yayın standardını geçmemesi için ancak özet halinde verilebilmiştir.

Tablo 1. Ticari entegre broiler işletmelerinin durumu.

1.İşletme sayısı ile işletmede çalışan erkek ve kadınların sayı ve %'si							
Kişi	İşletme sayısı	%	Erkek	%	Kadın	%	Toplam
1-2	14	33,33	15	11,45	13	27,08	28
3-5	17	40,47	47	35,88	16	33,33	63
6-10	9	21,43	51	39,93	15	31,25	66
10 ≤	2	4,76	18	13,74	4	8,33	22
2. İşletmede çalışanların yaşı							
			Sayı			%	
	>40		4			9,52	
	<40		20			47,62	
	Her ikisi		18			42,85	
3. İşletme sahibinin eğitim seviyesi							
			Sayı			%	
	Ortaokul Mezunu		11			26,19	
	Lise Mezunu		25			59,52	
	Üniversite Mezunu		6			14,29	
4. Çiftçilik (tavukçuluk) dışında başka bir işle de uğraşma durumu							
			Sayı			%	
	Evet		36			85,71	
	Hayır		6			14,29	

Tablo 2. Ticari entegre broiler işletmelerinin tipi, büyüklüğü, kümes kapasitesi ve yaşı.

5. İşletme tipi		
	Sayı	%
Aile	15	35,71
Şirket	27	64,29
6. İşletme büyüklüğü		
	Sayı	%
10 bin altı	7	16,67
10-30 bin	16	38,10
30-50 bin	7	16,67
50-100 bin	4	9,52
100 bin ve üzeri	8	19,05
7. Kümes sayısı		
Kümes sayısı	Sayı	%
2	16	38,10
3	8	19,05
4	6	14,29
5	2	4,76
6	6	14,29
8	2	4,76
10	2	4,76

8. Kümeslerin yaşı (yıl)

	Sayı	%
5-10	1	2,38
10 ve üzeri	41	97,62

Tablo 3. Ticari entegre broiler işletmelerinin hayvan ve yem temini, civciv durumu.

9. Girdi temini durumu		
	Sayı	%
Öz Sermaye	24	57,14
Her ikisi	18	42,86
10. Hayvan ve yem temini durumu		
	Sayı	%
Yurt içi sertifikalı işletmelerden temin	6	14,29
İşletme içinde temin	3	7,14
Sözleşmeli olarak çalışıyor	33	78,58
11. Metre kareye konan civciv sayıları		
1-7 Gün baş civciv sayısı/m ²	5 ilin toplamı (işletme sayısı)	
	Sayı	%
16	3	7,14
17	2	4,76
18	12	28,57
19	3	7,14
20	12	28,57
21	1	2,38
22	5	11,90
24	1	2,38
25	3	7,14
12. Eğer yem satın alınıyorsa 1 civcivin yem maliyeti		
	Sayı	%
Sözleşmeli Üretim	33	78,57
1,25 TL	1	2,38
1,3 TL	1	2,38
1,35 TL	2	4,76
1,4 TL	4	9,52
1,45TL	1	2,38

Tablo 4. Ticari broiler işletmelerinin besi süresi, yem temini, yem hazırlama ve yemleme tipi.

13. Besi süresi		
	Sayı	%
40 gün	4	9,52
45 gün	38	90,48

14. Ortalama Yemden yararlanma oranı (FCR)

	Sayı	%
1,75 altı	1	2,38
1,75-1,90	41	97,62

15. Kesif yem temini durumu

	Sayı	%
Kendi üretimi	3	7,14
Satın alma	6	14,29
Sözleşmeli üretim	33	78,57

16. Yemlerin verilmiş şekli ve teknik destek durumu

	5 ilin toplamı	
Otomasyon sistemi ile	40	95,24
Yarı insan gücü	2	4,76

17. Yem hazırlanma ve yemleme ile ilgili teknik destek durumu

	Sayı	%
Danışman var	22	52,38
Sözleşmeli üretim	20	47,62

Tablo 5. Ticari entegre broiler işletmelerinde kullanılan su, kümeslerin dezenfeksiyonu, ekipman- işçi kullanımı ve veteriner hekimlik hizmetleri.

18. Kullanılan suyun kaynağı

	Sayı	%
Şebeke suyu	32	76,19
Kuyu suyu	10	23,81

19. Birden fazla kümeslerde aynı işçi ve ekipman kullanımı durumu

	Sayı	%
Her kümesin işçi ve ekipmanı ayrı	19	45,24
Ekipman ayrı ancak işçi aynı	23	54,76

20. Veteriner hekimlik hizmetleri

	Sayı	%
Çiftlik veteriner hekimince sağlanmakta	1	2,38
Özel klinikten sağlanmakta	8	19,05
Sözleşmeli firmaya ait veteriner hekimler sağlanmakta	33	78,57

Tablo 6. Ticari entegre broiler işletmelerinde besi performansı göstergeleri ve et materyalinin pazarlanması durumu.

21. Et materyalinin pazarlanması

	Sayı	%
Kesim hanede kestirip satış	1	2,38
Kendi işletmesinde değerlendirme (market, et deposu)	2	4,76
Entegre tesisleriyle anlaşmalı satış	39	92,86

Tablo 7. Ticari entegre broiler işletmelerinde yıllık kesim sayısı, toplam kesilen hayvan sayıları, yıllık ölüm oranı, gübrenin kullanım ve örgütlenme durumu (kooperatif, birlik vs üyelik).

22. İşletmenizdeki yıllık kaç tavuk kesimi yapılmaktadır?

	Sayı	%
50 bin altı	6	14,29
50-150 bin	15	35,71
150-250 bin	7	16,67
250 bin -1 milyon	11	26,19
1 milyon üzeri	3	7,14

23. Gübrenin kullanım durumu

	Sayı	%
Çiftlik dışı kendi tarım arazisinde kullanım	33	78,57
İmha etme	9	21,43

Tablo 8. Ticari entegre broiler işletmelerinde tarımsal destek durumu (arazi, hayvan, yem bitkisi vs), hayvancılık faaliyetlerinden memnuniyet durumu ve gelecek planı.

24. Tarımsal destek durumu (arazi, hayvan, yem bitkisi vs)

	Sayı	%
Yararlanıyor	22	52,38
Yaralanmıyor	20	47,62

25. Hayvancılık faaliyetlerinden memnuniyet durumu ve gelecek planı

	Sayı	%
Memnunum ve yapmaya devam etmeyi planlıyorum	34	80,95
Memnunum ve yapmaya devam etmeyi planlamıyorum	3	7,14
Memnun değilim ve yapmaya devam etmeyi planlıyorum	5	11,90

Tablo 9. Ülkemizin farklı beş ilindeki (Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri ve Kırıkkale) entegre broiler işletmelerinin üretim yapmasını zorlaştıran unsurlar.

S. No	Broiler işletmelerinin üretim yapmasını zorlaştıran unsurlar	Sayı	%
1	Yem hammaddesi ve girdi fiyatlarının yüksek oluşu	26	12,38
2	Finansman ve kredi sorunu	23	10,95
3	Barınak ve ekipman sorunu	17	8,01
4	Ürün fiyatında yıl boyu dalgalanma, fiyat istikrarsızlığı	16	7,62
5	Teknik bilgi yetersizliği	16	7,62
6	Teknik ve nitelikli eleman yetersizliği	15	7,14
7	Ulaşım ve nakliye sorunu	14	6,66
8	Altyapı sorunu	11	5,23
9	Hayvan temininde güçlükler	11	5,23
10	Hastalıktan korunma ve aşılama güçlüğü	11	5,23

S. No	Broiler işletmelerinin üretim yapmasını zorlaştıran unsurlar	Sayı	%
11	FCR hedefini yakalayamama endişesi- zarar etme korkusu, verim düşüklüğü	10	4,76
12	Ekonomik kriz ve problemler	6	2,85
13	Hayvan hareketlerinin denetiminin yetersizliği	5	2,38
14	Arz talep dengesizliği	5	2,38
15	Pazar ve pazarlama sorunu	4	1,9
16	Gübre vb atıkların imhasının güçlüğü/ çevre kirliliği	4	1,9
17	Coğrafi şartların güçlüğü	2	0,95
18	Biyogüvenlik tedbirlerinin güçlüğü (işletmelerin farklı aşılama programları)	2	0,95
19	Bürokratik engeller	2	0,95
20	Kayıt dışı üretim ve kayıt dışı üretimin yeterince denetlenememesi	2	0,95
21	Kamu özel sektör işbirliğinin yetersizliği	2	0,95
22	Üretim takvimindeki sapmalar	2	0,95
23	İşletmelerin denetim yetersizliği	1	0,47
24	Devlet desteğinin yetersizliği	1	0,47
25	Piyasa ile rekabet etme gücü yetersizliği	1	0,47
26	Sözleşme şartlarının ağır olması	1	0,47
	210	%100	

Tablo 10. Hayvan barınaklarının durumu.

1. İşletme türü ve kümes tipi		
	Sayı	%
Kapalı sistem ve yerde	42	100
2. Kümes aydınlatma durumu (pencere tipi ve alanı)		
	Sayı	%
Yeterli	13	30,95
Yetersiz	29	69,05
3. Altlık temizliği		
	Sayı	%
Otomatik Sıyrıcı	17	40,48
Traktörle Mekanik Olarak	25	59,52

Tartışma ve Sonuç

İşletmelerin genel durumları

Tez çalışması kapsamında 42 adet entegre broiler işletmesinin mevcut durumları hakkındaki bilgiler değerlendirilmeye alınmıştır. Bu beş ildeki işletmelerin istihdam oranlarına genel olarak bakıldığında; işlet-

mede çalışan sayısı, %33,33'ünde 1-2 kişi, %40,47'sinde 3-5 kişi, %21,43'ünde 6-10 kişi ve %4,76'ında ise 10 ve üzeri kişi çalışan bulunmaktadır. İşletmelerde çalışanların çoğunun aile şeklinde istihdam edildiği görülmektedir. Diğer yandan işletmelerin büyük çoğunluğunun küçük ve orta kapasiteli işletmeler olduğu görülmektedir. İşletme sayısı 9 olan benzer bir çalışmada, 1-2 işçi çalıştıran işletme sayısının 6 (%66,6), 3-4 işçi çalıştıran işletme sayısının 1 (%11,1) ve 5 ve 5 den fazla işçi çalıştıran işletme sayısının ise 2 (%22,2) adet olduğu tespit edilmiştir (Karakaya ve ark 2019). Araştırma yapılan bu işletmedeki çalışanların %9,52'si 40 yaşın üstünde, %47,62'si 40 yaşın altında ve %42,85'nin ise yaşları 40 yaşın hem altında hem de üstündedir. Anket çalışması yapılan illerin genelinde 40 yaşın altında genç nüfusun çalıştığı görülmektedir. Karakaya ve ark (2019), yapılan benzer bir çalışmada, işletmecilerin %55,5'i 50 yaşından küçük, %44,5'i ise 50 yaş ve üzerinde olduğunu söylemektedirler. İşletmelerde ekonomik etkinlik ve üretimde verimlilik açısından eğitim önemlidir. Gerek işletme sahipleri gerekse çalışanlar yapmış olduğu işte ne kadar deneyimli ve bilgiliyse, o işletme o kadar başarılı olacak demektir. İşletmedeki kümeslerde bulunan hayvanların bakım ve beslemesi, sevk ve idaresi ve sağlıkları konusunda daha hassas davranılacaktır. Bu da verimliliği ve kaliteyi artıracaktır. Bu bağlamda araştırma yapılan bu illerde, işletme sahiplerinin %26,19'u ortaokul, %59,52'si lise ve %14,29'u ise üniversite mezunu olduğu belirmiştir. Bu çalışmada işletme sahiplerinin genelde eğitim düzeylerinin iyi olduğu görülmektedir. Ancak bu illerde eğitim durumu iyi olmasına rağmen hem sektörle hem de veterinerlikle ilgili olarak gerekli eğitimin yeterince alınmadığı da gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada işletmecilerden ilköğretim mezunu olanların oranı %44,5, ortaokul mezunu olanların oranı %11,1, lise ve üniversite mezunu olanların oranı ise %22,2 olarak belirlenmiştir (Karakaya ve ark 2019). Araştırma yapılan bu illerde işletmelerin %85,71'inin çiftlik dışında başka bir işle de uğraştığı, %14,29'unun ise sadece çiftlik ile uğraştığı görülmektedir. İşletmelerin %35,71'inin aile tipi ve %64,29'unun ise şirket olduğu görülmektedir. Şirket sayısının artması ile işletmedeki hayvan varlığının ve üretimin de arttığı bir aşîkârdır. Malatya ilinde yapılan bir çalışmada, işletmelerin %94,8'inin şahsa ait olduğu ancak özel bir firmayla sözleşmeli üretim yaptığı, %3,8'inin kendi firması ve %1,4'ünün şahsa ait olarak üretim yaptığı bildirilmiştir (Boyras 2016; Karakaya ve ark 2019). Bir başka çalışmada kümeslerin %6,9'unun herhangi bir firmaya bağlı olmadığı, %93,1'inin bir firma ile birlikte çalıştığı belirlenmiştir (Yenilmez 2005). İşletme büyüklüklerinin %16,67'sinin 10 bin altı olduğu,

%38,10'unun 10-30 bin arası olduğu, %16,67'sinin 30-50 bin arası olduğu, %9,52'sinin 50-100 bin arası olduğu ve %19,05'inin ise 100 bin ve üzeri olduğu görülmektedir. İşletmelerin %38,10'unda 2 kümes, %19,05'in 3 kümes, %14,29'unda 4 kümes, %4,76'sında 5 kümes, %14,29'unda 6 kümes, %4,76'sında 8 kümes ve %4,76'sında ise 10 kümes olduğu görülmektedir. İşletmelerin %2,38'inde kümesin yaşı 5-10 yıl arası olup, %97,62'inde ise 10 yaş ve üzeri olduğu görülmektedir. Araştırmanın yapıldığı bu illerde işletmelerin girdi temini durumuna göre işletmelerin %57,14'ünün öz sermaye kullandığı, %42,86'sının ise hem öz sermaye hem de kredi ve teşvik kullandığı görülmektedir. Benzer bir araştırmada kümes sahiplerinin %15,1'inin yetiştiriciliğe başlarken kredi aldığı, %84,9'unun ise kredi almadığı belirtilmiştir (Yenilmez 2005). Türkyılmaz (2006) tarafından yapılan çalışmada, işletmelerin %38,7'sinin kendi imkanlarını kullandıkları, %61,3'ünün ise krediye ihtiyaç duydukları belirtilmiştir. Boyraz (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, işletmelerin %53,2'sinde finansmanının banka kredisiyle, %35'inde finansmanının işletmecinin kendisi tarafından ve %21,8'inde ise finansmanının Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (TKDK) tarafından sağlandığı belirlenmiştir (Karakaya ve ark 2019). Araştırmanın yapıldığı bu illerde metre kareye konan civciv sayısı (civciv/ m²) 16 ile 25 arasında değişmektedir. Bazı araştırmacılar kümesteki m²'ye konulacak civciv miktarını hayvanların kesim ağırlıklarını dikkate alarak hesaplamıştır. Örneğin birim m²'de üretilcek toplam etlik piliç canlı ağırlığı 32 kg ise, her birisi yaklaşık 2 kg canlı ağırlıkta olan 16 adet piliç m²'de var demektir (Şenköylü 2001). Eğer kümeste birim alanda yoğun bir üretim yapılırsa hem verim azalır hem de ölüm miktarı artar (Bell 2002). Fakat mevsimlere göre değişmek üzere soğuk aylarda m²'ye canlı ağırlığı 1 kg olan 35 adet piliç konabilirken, canlı ağırlığı 2,3 kg olanlardan 15 adet piliç konabilir (Çakır 2003). Yine bu illerde illere göre farklılık göstermek üzere, işletmelerin büyük çoğunluğu sözleşmeli olarak üretim yapmaktadırlar. Yemin satın alındığı veya işletme içinde kendilerinin ürettiği işletmelerde ise bir civcivin yem maliyetinin yaklaşık 1,25 TL ile 1,45 TL arasında değiştiği görülmektedir. İşletme kurulup hayvan temini gerçekleştirdikten sonra, hayvancılık işletmelerinin sabit giderlerinin %70'e kadarki kısmını yem giderlerinin oluşturduğu bilinmektedir (Ergün ve ark 2002). Araştırmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmesinden 38 adedinde besi süresinin 45 gün olduğu, 4 adet işletmede ise 40 gün olduğu görülmektedir. Broiler üretimi yapan işletmeler, civcivleri aynı anda kümes yerleştirir. İyi bakım, besleme, sevk ve idare ile 35-49 gün arasında istenilen canlı

ağırlığa ulaşıncı hepsini aynı anda keser veya pazarlarlar. Bu yöntem önemlidir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Yine bu işletmelerde FCR, 41 adet işletmede 1,75-1,90 arasında iken, bir işletmede ise 1,75'tir. FCR oranına göre üreticilerin başarılı oldukları görülmektedir. FCR, hayvanın yediği yemi ete dönüştürme oranı demektir. FCR oranı ne kadar düşük ise verim o kadar iyi demektir. Karakaya ve ark (2019) da yaptığı bir çalışmada kümeslerde besi süresinin 42-45 gün arasında değişmekte olduğunu belirtmişlerdir. Broiler işletmeciliğinde en az maliyetle hayvan başına maksimum verimi elde etmek amaçtır. Üretimden pazar aşamasına kadar bu sürecin her aşaması kayıt altına alınır. Bu kayıtların günlük olarak tutulması esastır. Bu kayıtlar sayesinde bir üretim periyodundaki üretilen materyalin performansı rahatlıkla belirlenebilir (Şenköylü 2001). Her bir broiler bir üretim periyodunda (35-49 gün) yaklaşık 3,6-4,1 kg yem tüketerek yaklaşık 1,9-2,5 kg canlı ağırlığa ulaşabilir. Bu oran hayvanın yemden yararlanma derecesine, yaşına, ırkına, cinsiyetine ve yemin bileşimine göre değişir. Bezer bir araştırmada bir üretim periyodu sonunda et tavuklarının %45'inin 3,6-3,8 kg ve %55'inin ise 3,8-4,4 kg canlı ağırlıkta olduğu söylenmiştir (Arıç 1996). Yine bezer bir araştırmada, bir üretim periyodu sonunda her bir broiler için canlı ağırlığın 1,820 kg $\pm$ 5g olduğu belirtilmiştir (Erdem 1996). Araştırmanın yapıldığı bu işletmelerde kesif yem temini durumu; 3 adet (%7,14) işletmede kesif yem temini kendi üretimi, 6 adet (%14,28) işletmede kesif yem temini satın alma ve 33 adet (%78,57) işletmede ise kesif yem temini sözleşmeli üretim (civciv ve yemi veren asıl firma tarafından karşılanmaktadır) şeklindedir. Yenilmez (2005), yaptığı bir araştırmada işletmelerin %81'inde yemin dışarıdan alındığını belirtmiştir. İşletmelerin karlılığını etkileyen en büyük faktörlerden birisi kesif yem teminidir. Ayrıca yemlerin işletmede üretim durumunun işletme büyüklüğü ile ilgili olduğu görülmektedir. İşletme büyüklüğü arttıkça yemlerin işletme dışından temin oranı düşmektedir. Yine bu işletmelerde yemlerin veriliş şekli ve teknik destek durumu; 2 adet işletmede yarı insan gücü ile 40 adet işletmede ise otomasyon sistemi ile olduğu görülmektedir. Yapılan benzer bir çalışmada kümeslerin %57'sinde tam otomatik yemlik kullanıldığı söylenmiştir (Yenilmez 2005). Araştırmanın yapıldığı bu işletmelerde yem hazırlama ve yemle ilgili teknik destek durumu; 22 adet işletmede yemin hazırlanması ve yemle ilgili teknik destek danışman aracılığı ile yapıldığı, 20 adet işletmede ise yemin hazırlanması ve yemle ilgili teknik destek, sözleşmeli üretim olduğu için, üretimi yaptıran firmanın sağladığı görülmektedir. Broiler işletmeciliğinde en az maliyetle hayvan başına maksi-

mum verimi elde etmek istenir. Bunun için de hayvanların serbest yöntemle beslenmeleri tercih edilir (Şenköylü 2001). Yapılan araştırmada yine bu işletmelerin tamamında vitamin, mineral madde, probiyotik ve prebiyotik kullanıldığı, ancak hiç birinde herhangi bir antibiyotik kullanılmadığı görülmektedir. Araştırmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmesinde kullanılan suyun kaynağı ise 32 adedinde şebeke suyu ve 10 adedinde kuyu suyu kullanıldığı görülmektedir. Her partiden önce bu işletmelerin tamamında kümeslerin dezenfekte edildiği belirtilmektedir. Yine bu işletmelerin 19 adedinde her kümesin işçi ve ekipmanın ayrı, 23 adedinde ise ekipman ayrı ancak işçilerin aynı olduğu görülmektedir. Bu işletmelerin tamamında aşılamaların düzenli yapıldığı belirtilmektedir. Bu işletmelerde veteriner hekim hizmetlerini; 1 adet işletmede çiftlik veteriner hekimi sağlamakta, 9 adet işletmede özel klinikten sağlamakta ve 33 adet işletmede ise sözleşmeli üretim olduğu için, üretimi yaptıran firmanın veteriner hekimlerinin sağladığı görülmektedir. İşletmelerin kümesleri dezenfekte etmesi, aşılamaların düzenli yapılması ve veteriner hekimlik hizmetlerini aksatmamaları sağlık ve üretim konusunda bilinçli olduklarını göstermektedir. Araştırmanın yapıldığı beş ildeki 42 adet işletmenin hiç birinde ihbarı mecburi ve önemli kanatlı hayvan hastalıklarına rastlanılmamıştır. Bu da işletmelerimizin bu hastalıklardan arı olduğunu göstermektedir. Bu konuda Tarım ve Orman Bakanlığının bu hastalıklar ile mücadele için çıkarmış olduğu mevzuat (kanun, yönetmelik, talimat, genelge vb.), yapmış olduğu denetim ve kontroller, izlemeler ve kayıt sisteminin başarılı bir şekilde uygulandığını ve işletme sahiplerinin de bu konularda bilinçlendiğini göstermektedir. Çalışmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmelerinde besi performansı göstergelerinin tamamı BSCA ve FCR olarak görülmektedir. Bu işletmelerde et materyalinin pazarlanması; 1 adet işletmede kesimhanede kestirip satış şeklinde (%2,38), 2 adet işletmede kendi işletmesinde değerlendirme şeklinde (market, et deposu vs) (%4,76) ve diğer 39 adet işletmede ise entegre tesisleriyle anlaşmalı satış şeklinde (%92,86) olduğu görülmektedir. Yapılan benzer bir çalışmada kümeslerin %69,2'sinde hayvan satışlarının canlı olarak, %22,6'sında kesilmiş olarak ve %8,2'sinde ise satışların talebe göre değiştiği; satışların %95'inin toptan, %1,3'ü perakende ve %3,8'inin de hem toptan hem perakende şeklinde yapıldığı tespit edilmiştir (Yenilmez 2005). Yine bu işletmelerin tamamında yıllık 4-6 arası kesim yapıldığı belirtilmektedir. Yıllık olarak kesimi yapılan broiler miktarları ise, işletmelerin %14,29'unda 50 bin altı, %35,71'inde 50-150 bin arası, %16,67'sinde 150-250 bin arası, %26,19'unda

250 bin-1 milyon arası ve %7,14'ünde ise 1 milyon üzeri kesim yapıldığı görülmektedir. Broiler işletmeciliğinde üretim periyodunun uzunluğu ve sayısı verimlilik açısından oldukça önemlidir. Bir üretim periyodu birinci olarak civcivlerin kümese konmasından kesime kadar ki üretim süresini kapsar (35-49 gün). İkinci olarak da etlik piliçlerin kesiminden sonra kümesin ve ekipmanların temizliği, dezenfeksiyonu ve kümesin tekrar üretime hazırlanmasını kapsar (14 gün). İşte hem üretim hem de temizlik süreleri bir üretim periyodunu oluşturur (2 ay). Broiler işletmesinde bir üretim periyodunun yaklaşık 2 ay olduğu düşünülürse, bir yılda da yaklaşık 6 adet devir yapılabilir (Çetin 1984). Fakat üretim periyodunu canlı ağırlık, pazar şartları, tüketicilerin talepleri, yem fiyatları, etlik piliç satış fiyatı, hastalıklar ve işletme şartları değiştirebilir. Bunlara bağlı devir sayısı azalabilir (Erdem 1996). Bir broiler işletmesinde yıllık 6 adet devir yapılabileceği beyan edilmektedir (Çetin 1984). Broiler işletmesinde yapılan benzer bir çalışmada ülkemizin devir sayısı yaklaşık 5,4 bulunmuştur (Gürsoy 1976). Araştırma yapılan tüm işletmelerdeki yıllık ölüm oranı ise %3-4 olarak belirtilmektedir. Çünkü yıllık ölüm oranının %5'i geçmesi durumunda işletmenin zarar edeceği beyan edilmektedir. İşletme sahipleri bunu çok iyi bilmektedirler. Broiler işletmesinde yapılan benzer bir çalışmada ülkemizin broiler yatağı yaklaşık %4,85 olarak belirlenmiştir (Gürsoy 1976). Araştırmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmelerinde dönem sonu oluşan gübrelerin durumu; 33 adet işletmede elde edilen gübre (taşıma esnasında çevreye zarar vermemek üzere sızdırmaz kapalı araçlarla dikkatli bir şekilde taşınarak) çiftlik dışı kendi tarım arazisinde kullanıldığı, 9 adet işletmede ise elde edilen gübrenin imha edildiği görülmektedir. Tüm işletmelerde ise izole edilmiş gübrelikler vardır. Çalışmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletme sahiplerinin tamamının tarımsal örgüte üye oldukları görülmektedir. Bu işletmelerin tarımsal destek durumu (arazi, hayvan, yem bitkisi vs) ise 22 adet işletmenin bu desteklerden yararlandığı, 20 adet işletmenin de bu desteklerden yararlanmadığı belirtilmektedir. Beş ilin toplamına baktığımızda yine bu işletmelerin hayvancılık faaliyetlerinden memnuniyet durumu ve gelecek planları ise, 34 işletmenin "*Memnunum ve yapmaya devam etmeyi planlıyorum.*" dediği, 3 işletmenin "*Memnunum ve yapmaya devam etmeyi planlamıyorum.*" dediği ve 5 işletmenin de "*Memnunum değilim ve yapmaya devam etmeyi planlıyorum.*" dediği görülmektedir. Büyük bir çoğunluğunun hayvancılık faaliyetinden memnun olduğu ve devam edeceği anlaşılmaktadır.

Sektörde üretim yapmayı zorlaştıran unsurlar

Araştırmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmelerinde beş ili beraber değerlendirdiğimizde 26 adet ortak sorun olduğunu görmekteyiz. İşletmelerin en önemli sorununun yem hammaddesi ve girdi fiyatlarının yüksek oluşu (%12,38) olduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle, yem ve girdi maliyetlerinin karlılık açısından son derece önemli olduğu bilinmektedir. İşletmelerin en çok yem ve girdi maliyetlerinden şikâyetçi olmaları beklenen bir sonuçtur. İkinci en önemli sorunun finansman ve kredi sorunu (%10,95) olduğu ifade edilmiştir. Üçüncü sırada barınak- ekipman sorunu (%8,01) olduğu belirtilmiştir. Dördüncü ürünün fiyatında yıl boyu dalgalanma ve fiyat istikrarsızlığı (%7,62), beşinci teknik bilgi yetersizliği (%7,62), altıncı teknik ve nitelikli eleman yetersizliği (%7,14), yedinci ulaşım ve nakliye sorunu (%6,66), sekizinci altyapı sorunu (%5,23), dokuzuncu hayvan temininde güçlükler (%5,23), onuncu hastalıktan korunma ve aşılama güçlüğü (%5,23), onbirinci FCR hedefini yakalayamama endişesi- zarar etme korkusu, verim düşüklüğü (%4,76) ve onikinci ekonomik kriz ve problemler (%2,85) şeklinde sıralanırken kalan diğer 14 madde toplamı da sorunun %12,34'ünü oluşturmaktadır. Broiler işletmeleri ile ilgili yapılan benzer bir çalışmada işletmelerin sorunları; yetiştirme güçlüğü, verim düşüklüğü, yem tedariki, barınak yetersizliği, pazarlama ve entegrasyon zorluğu, teknik bilgi eksikliği, yetersiz araştırma, sağlık ve eğitim şeklinde sıralanmıştır (Akkılıç ve ark 1982). Hayvan işletmeleri ile ilgili yapılan benzer bir çalışmada işletmelerin sorunları; yetiştirme güçlüğü, yem tedariki, teknik personel eksikliği, hastalıklarla mücadele, fiyat istikrarsızlığı, finansman ve destek yetersizliği olarak söylenmiştir (Testik 1988). Broiler işletmeleri ile ilgili ülkemizde yapılan benzer bir diğer çalışmada işletmelerin sorunları; hastalıklarla mücadele, yetiştirme güçlüğü, barınak yetersizliği, pazarlama ve entegrasyon, finansman yetersizliği, sağlık ve eğitim şeklinde sıralanmıştır (Şenköylü 2001). Broiler işletmeleri ile ilgili yapılmış olan benzer bir çalışmada ise işletmelerdeki sorunların giderilmesi için, her işletmenin üretim plan ve programını yapması, üretimin her aşamasının izlenmesi, üretimin ve verimliliğin artırılması, pazar şartlarının iyileştirilmesi, üretimden kesime kadar barkot sisteminin uygulanması şeklinde belirtilmiştir (Türkoğlu 1995), Hayvan işletmeleri ile ilgili yapılan benzer bir diğer çalışmada işletmelerin sorunları; yem tedariki, hayvan temini, teknik personel eksikliği, hastalıklarla mücadele ve fiyat istikrarsızlığı olarak söylenmiştir (Ariç 1996). Hayvan işletmeleri ile ilgili yapılan benzer bir çalışmada ise işletmelerin sorunları; yetiştirme güçlüğü, alt yapı

yetersizliği, yem tedariki ve hastalıklarla mücadele olarak söylenmiştir (Can 1997). Hayvan işletmeleri ile ilgili yapılan benzer bir diğer çalışmada işletmelerin sorunları; hayvan temini, yem tedariki, hastalıklarla mücadele, barınak yetersizliği, teknik personel eksikliği, teknik bilgi yetersizliği, pazarlama güçlükleri, fiyat istikrarsızlığı, dış pazarlara açılama şeklinde sıralanmıştır (Bülbül ve ark 1999). Boyraz (2016) ise yapmış olduğu bir çalışmada işletmecilerin sorunlarının %87'sinin eğitim, % 84,4'ünün kredi temini ve %1,3'ünün yem ve hastalık olduğunu bildirmiştir (Karakaya ve ark 2019). Yapılan benzer bir çalışmada ise yetiştiricilerin, işletmedeki yem ve girdi maliyetlerinin yüksek oluşundan, kar edememelerinden ve pazarlama güçlüğünden yakındıkları söylenmiştir (Öztürk ve ark 2002). Broiler işletmelerinde üretimde verimliliğin artırılması ve işletmelerin problemlerinin çözüme kavuşturulması için, bütün üretici, tüketici, tedarikçi özel sektör temsilcileri ile devletin temsilcileri arasında iş birliği yapılması şarttır. Konuyla ilgili plan ve toplantı yapımları rutin hale gelmelidir. Benzer bir çalışmada, toplumda sağlıklı ve dengeli beslenme bilincini uyarmak için, tavuk eti tüketimi teşvik edilmeli, işletmelerde yatırımlar iyi planlanmalı, üretimden pazara kadar her aşama iyi takip edilmeli, üretici, tüketici ve tedarikçi firmaların, modern entegre tesislere yatırım yapmaları hususunda desteklenmelerinin önemli olduğu belirtmiştir (Kenanoğlu ve ark 1999). Bu yatırımlar uzun vadeli olduğu için teşvik sisteminin de kalıcı olmasına dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamaktadırlar. Üretici firmaların hem içeride hem de dışarıda rekabet edebilmesi için finansman imkanlarının artırılması ve buna uygun politikaların geliştirilmesinden bahsetmişlerdir. Hayvancılık sektörünün sürdürülebilirliği ve başarılı olabilmesi için her zaman destek sağlanması gerekmektedir (Köseman ve ark 2016).

Hayvan barınaklarının genel durumları

Entegre broiler işletmelerinde, gerekli hayvan refahının sağlanması daha fizibilite ve proje aşamasında düşünülmelidir. Buna göre işletme kurulmalıdır. Kümesler hayvanların doğal hareketlerini sınırlandırmamalı, beslenme programının rahat uygulanmasına imkan sağlamalıdır. Kümes içi ve dışındaki çevre şartlarının olumsuz etkilerinden hayvanlar korunmalıdır. Beslenmeleri doğal ve hijyenik şartlarda yapılmalıdır (Mutaf ve ark 2001). Araştırmanın yapıldığı 42 adet entegre broiler işletmelerinde işletme türünün tamamının kapalı sistem olduğu, kümeslerin yerde kümes tipi seçtiği ve kümes havalandırma sistemlerinin otomasyon sistemi, fanlar ile zorlamalı havalandırma, olduğu görülmektedir. Araştırmadaki

işletmeler için bu önemli bir durumdur. Çünkü havalandırma sisteminin kümeslerde çok iyi olması elzemdir. Sıcaklık arttığında hareket azalma, yem sarfiyatında azalma, su tüketiminde artma ve cinsel isteksizlik oluşmaktadır (North 1972). Kümes içi sıcaklığın istenilen seviyede tutulması, bakım, besleme, sevk ve idare broilerler için önem taşır (Weaver 2002). Havalandırma mevsim ve çevre şartlarına göre değişebilir. Sıcak havalarda havalandırma, kümes içinde tavuklardan gelen ısıyı ve çevreden kümese giren ısı, toz, gaz gibi maddeleri dışarı atmaya katkı sağlar. Dışarıdan da filtre edilmiş temiz havanın kümese girişini sağlar. Soğuk havalarda ise kümes-te birikmiş rutubeti ve amonyak kokusunu dışarı atmaya kolaylaştırır. Dışarıdan da filtre edilmiş temiz havanın kümese girişini sağlar (Şenköylü 2001). Kümeslerin sıcak zamanlarda serinletilmesi, soğuk zamanlarda da ısıtılması yemden yararlanmayı artırır. Bu da tavukların verimini ve sağlığını olumlu etkiler. Bu işletmelerde kümeslerin aydınlatma durumları (pencere tipi ve alanı)'nın 13 adet işletmede yeterli olduğu ve 29 işletmede ise yetersiz olduğu görülmektedir. Kümeslerde sürekli aydınlatma esastır. Bu gün hala geleneksel tarzdaki kümeslerde bu yöntem devam edilmektedir. Gün ışığı zamanlarında pencerelerden doğal ışık alınır. Ancak gece ise düşük aydınlatma kapasiteli lambalarla kümes aydınlatılır. İlk günlerde 24 saat aydınlatma yapılır. Sonra elektrik kesintilerine karşı geceleyin 1-2 saat karatma yapılır. Yine de bu esnada basit fenerlerle ve boyalı ampullerle kümes aydınlatılır. Bundan dolayı kümeste 23 saat aydınlatma ve 1 saat karatma dönemi uygulanır (Türkoğlu 1997; Erensayın 2001). Geleneksel tarzdaki kümeslerde hem devamlı aydınlanma hem de sınırlı aydınlanma yapılabilmektedir (Türkoğlu 1997). Anket çalışması yaptığımız işletmelerin bütün kümeslerinde elektrik enerjisiyle devamlı aydınlanma yapılmaktadır. Ayrıca elektrik kesintilerine karşı kümesteki hayvanlar karartmaya da alıştırmışlardır. Yine bu işletmelerin yemlik tipi, adedi ve boyutlarının yeterli olduğu, suluk tipi, adedi ve büyüklüklerinin de yeterli olduğu ve asma suluk tipi oldukları gözlemlenmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada tüm kümeslerde tavana asılarak sarkıtılan çanlı suluklar tercih edildiğini (Donar 1994), bir diğer yapılan çalışmada ise tüm kümeslerde sulukların %88'inin otomatik olduğu söylenmişlerdir (Arıç 1996). Günümüzde kümeste kullanılan tüm suluklar tam otomatiktir. Bu işletmelerin altlık temizliği ise, 17 adet işletmede otomatik sıyırıcıyla ve 25 adet işletmede de traktörle mekanik olarak yapıldığı belirtilmektedir. Tavukçuluk işletmeleri modern tesisleşme sayesinde kümeste kaliteli ekipmanları kullanmayı hedeflemektedirler. Hedeflenen bu ekipmanlar oto-

masyon sistemidir. Bu da kümes içinde entegrasyonu sağlayacağı için işgücünden tasarruf ettirecektir.

Sonuç olarak, araştırma yapılan illerin entegre broiler işletmelerinin genel durumuna bakıldığında işletmelerin giderek büyüdüğü, işletme sahiplerinin eğitim düzeylerinde iyileşme olduğu ve buna bağlı olarak bilgi ve teknoloji kullanım eğilimlerinin geliştiği, hayvan barınak durumlarının genel olarak iyi durumda; entegre işletmeler olduğu görülmektedir. Bunun yanında sektöre yönelik yapısal problemler ve hayvancılık politikaları birlikte ele alındığında, sektörün gelişimi için devletin yapması gereken ciddi iyileştirmelerin vatandaş tarafından beklenildiği görülmektedir. Üretimi artırmak ve illerdeki işletmelerin sorunlarının çözümü için işletmeciler, damızlık yetiştiricileri, yem üreticileri, pazarlamacılar ve konuyla ilgili Tarım ve Orman Bakanlığı başta olmak üzere devlet kuruluşları düzeyinde teknik ve ekonomik açıdan iyi bir organizasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvancılık sektörü, stratejik nitelikli ve yüksek riskli olması nedeniyle içeride ve dışarıda meydana gelecek her olaydan etkilenecek dalgalanma gösterebilmektedir. Bu nedenle hayvancılık sektörünün sürdürülebilirliği ve başarılı olabilmesi için her zaman destek sağlanması gerekmektedir. Ayrıca işletme sahiplerinin işlerini en fazla zorlaştıran 26 farklı sorun tespit edilmiş olup, bu sorunların başında da yem ve girdi maliyetleri olduğu ifade edilmiştir. İşletmelerin ortak sorunlarının ulusal çerçevede ele alınıp çözülmesi gerekirken, diğer bölgesel sorunların ise bölgelerinde çözülmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Kurulu Kararı: Çalışmada deney hayvanı kullanılmamıştır. Anket çalışmasıyla durum tespiti yapılmıştır.

Kaynaklar

- Akkılıç M, Aksoy FT. (1982) Türkiye'de tavukçuluğun ana sorunları. Uluslararası Bilimsel Tavukçuluk Kongresi, 24-25 Mayıs, Syf:27-33. Ankara.
- Anonim. (2004) Erişim adresi: http://www.tarim.gov.tr/arrayuz/9/icerik.asp?efl=../uretim/istatistikler/istatistikler.&curdir=\\uretim\\istatistikler&fl=uretim_istatistikleri\\hayvansal_uretim\\dunya\\yumurta_uretimi.htm, Erişim tarihi: 24.12.2004. 22:57
- Arıç H. (1996) Çukurova bölgesi broiler yetiştiriciliğinin yapısı ve sorunları. Yüksek Lisans Tezi S.45. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bell DD. (2002) *Management in Alternative Housing Systems*. (D. D. Bell, W. D. Weaver Edited). Commercial Chicken Meat And Egg Production, Kluwer Academic Publishers, Fifth Edition, s.1365, Virginia. 109
- Boyras FÖ. (2016) Malatya ilindeki etlik piliç işletmelerinin teknik ve yapısal özellikleri. Bingöl Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi S. 81, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl.

- Bülbül M, Gündoğmuş E. (1999) Türkiye’de et tavukçuluğu endüstrisinde üretim ve pazarlama aşamasında karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri. VIV. Poultry Yutav’99. Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı. 3-4-5-6/06/1999, Syf:258-267, İstanbul.
- Can H. (1997) Türkiye’de broiler üretiminin sorunları. Tavukçunun Sesi Dergisi. Yumurta Üreticileri Derneği Yayın Organı, 79:69-71, İstanbul.
- Çakır R. (2003) *Tavuk yetiştiriciliği*. Erişim adresi: http://www.kanatli.net/asp/tavuk_1.asp, Erişim tarihi: 16.12.2004. 22:01
- Çetin B. (1984) Ankara ili kasaplık piliç işletmelerinin ekonomik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Tarım Ekonomisi Bölümü, Ankara.
- Donar H. (1994) Adana-Mersin illerinde broiler üretim ekonomisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Erdem M. (1996) Tarsus Köy-Tür A. Ş. bağlantılı broiler işletmelerinin verimlilik yönünden karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, s.104, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Erensayın C. (2001) *Yeni tavukçuluk bilimi*. Nobel yayın dağıtım, 324 s, Ankara.
- Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan I, Yalçın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A. (2002) *Yemler ve Yem Hijyeni ve Teknolojisi Ed.*, Seher Küçükersan, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Besleme Hastalıkları ABD, Syf:238-274, Ankara.
- Gürsoy O. (1976) Kasaplık piliç üretiminde verimlilik ölçümü: İşletmeler, iller ve bölgeler arası karşılaştırmalar. M.P.M. Milli Produktivite Merkezi Yayınları. No:22 s. 121, Ankara.
- Karakaya E, İnci H, Yiğit B. (2019) Bingöl ilindeki etlik piliç işletmelerinin teknik özellikleri. Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Akademik Ziraat Dergisi 8(2):Syf:265-274, 2019.
- Kenanoğlu Z, Saner G, Kaya F. (1999) Türkiye’de Ege bölgesinde hayvancılık sektörüne yönelik teşvik belgeli yatırımlar kapsamında tavukçuluğun yeri ve önemi üzerine bir inceleme. Uluslararası Hayvancılık’99 Kongresi. 21-24 Eylül. 259-266, İzmir.
- Köseman A, Şeker İ. (2016) Malatya ilinde sığırcılık işletmelerinin mevcut durumu 1. yapısal özellikleri, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Dergisi Syf:05-12.
- Mutaf S, Aklan S, Şeber N. (2001) Hayvan barınaklarının projelendirme ilkeleri ve GAP yöresi için uygun barınak tipleri. TMMOB Makine Mühendisler Odası, II. GAP ve Sanayi Kongresi, 29-30 Eylül, Diyarbakır, 2001
- North MO. (1972) *Commercial chicken production manual*. The Avia Publishing Company, s.469, California.
- Öztürk F, Durmuş İ. (2002) Türkiye’deki tavukçuluk işletmelerinin genel durumu. Erişim adresi: <http://www.tae.gov.tr/page.php?ID=22>, Erişim tarihi: 24.12.2004. 23:49
- SPSS. (2016) Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Eylül 2016.
- Şahan Ü, İpek A, Budak Ş. (1998) Bursa ve Balıkesir illerinde tavukçuluğun durumu ve Türkiye genelindeki yeri. II. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 22-25 Eylül, Syf:489-496 Bursa.
- Şenköylü N. (2001) Modern tavuk üretimi. Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Tekirdağ.
- Testik A. (1988) *Çukurova bölgesi yumurta tavukçuluğunun teknik yapısı*. Doğa Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi. 12 (3: 229-242), Ankara.
- TÜİK. (2017) Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Erişim adresi: www.tuik.gov.tr, Erişim tarihi: 18.03.2017.Saat:19:00
- Türkoğlu M. (1995) Türkiye tavukçuluğunun durumu. YUTAV’95 Uluslar Arası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı. 14-21, İstanbul.
- Türkoğlu M. (1997) Tavukçuluk, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Lisans Üstü (Ders Notları), Ankara.
- Türkyılmaz KM. (2006) Aydın ili broiler işletmelerinin yapısal ve teknik durumu üzerine bir araştırma. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(1-2):Syf: 65-69.
- Yenilmez F. (2005) Çukurova yöresindeki (Adana ve İçel illerindeki) broiler ve yumurta tavuğu işletmelerinin yetiştiricilik, teknik ve yapısal özellikleri üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yüzbaşı Ş. (2012) Bandırma ilçesi kasaplık piliç işletmelerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Weaver WD. (2002) *Poultry housing*. (D. D. Bell, W. D. Weaver Edited). Commercial chicken meat and egg production, Kluwer Academic Publishers, Fifth Edition, s.1365, Virginia.



Case report: Isolation of *Scopulariopsis brevicaulis* from Wistar Rats

Özlem Şahan Yapıcıer^{1*}, Mehmet Kaya², Zeki Erol³, Dilek Öztürk⁴

^{1,2,4} Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Department of Microbiology, Burdur, TURKEY

³ Mehmet Akif Ersoy University, Experimental Animal Production and Experimental Research Center, Burdur, TURKEY

Geliş Tarihi / Received: 13.07.2020, Kabul tarihi / Accepted: 07.12.2020

Abstract: *Scopulariopsis brevicaulis* is a saprophytic fungus that has wide geographic distribution. This study describes a case of hair loss and skin lesions observed in male and female Wistar rats due to *Scopulariopsis brevicaulis* infection in Turkey. Skin scrapings and hair samples from three male and two female rats were provided by the Experimental Animal Production and Experimental Research Center of Mehmet Akif Ersoy University to the Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology Laboratory in Burdur for analysis in July 2019. Microbiological methods were used for species identification and *Scopulariopsis brevicaulis* was isolated from all of the samples. The rats completely recovered without treatment and had no recurrence of clinical signs at one month post-sampling. This study is the first report of *S. brevicaulis* causing an infection in Wistar rats in Turkey.

Keywords: Laboratory animals, mycological examination, rats, saprophyte, *Scopulariopsis* sp

Olgu sunumu: Wistar Ratlarından *Scopulariopsis brevicularis* izolasyonu

Özet: *Scopulariopsis brevicaulis*, geniş coğrafi dağılımı olan saprofitik bir mantardır. Bu olgu, Türkiye'deki erkek ve dişi Wistar ratlarında *Scopulariopsis brevicaulis* enfeksiyonuna bağlı olarak gözlenen tüy kaybı ve deri lezyonlarını tanımlamaktadır. Üç erkek ve iki dişi albino Wistar ratından deri kazıntıları ve tüy örnekleri, Temmuz 2019'da analiz için Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi tarafından Burdur Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderildi. Mikrobiyolojik yöntemler tür identifikasyonu için kullanıldı ve tüm örneklerden *Scopulariopsis brevicaulis* izole edildi. Tüm ratlar tedavi gerektirmeden iyileşti ve örneklemekten bir ay sonra klinik belirtiler nüksetmedi. Bu çalışma, *S. brevicaulis*'in Türkiye'deki Wistar ratlarında enfeksiyona neden olduğunu bildiren ilk rapordur.

Anahtar kelimeler: Laboratuvar hayvanları, mikolojik muayene, ratlar, saprofit, *Scopulariopsis* sp

Introduction

Scopulariopsis (Microascus) spp. belongs to the ascomycete family *Microascaceae* and is a ubiquitous, saprobic mold found worldwide in soil, plant debris, wood, paper, animal matter, air, and moist indoor environments (Abbott et al. 1998; Anandan et al. 2008). The genus *Scopulariopsis*, and predominantly *S. brevicaulis*, is known to be an opportunistic pathogen that is thought to cause invasive (immunocompetent and immunosuppressed patients) and non-invasive infections such as, onychomycosis, keratitis, conjunctivitis, endocarditis, and disseminated in animals and humans (Ragge et al. 1990; Tosti et al. 1996; Iwen et al. 2012; Cawcutt et al. 2015; Kordalewska et al. 2016; Hampson et al. 2019).

This study aimed to describe a case of hair loss and skin lesions due to *Scopulariopsis brevicaulis* infection in male and female Wistar rats in Turkey.

Material and Methods

A total of three male and two female rats were housed in cages with controlled 8 h of light and 16 h of darkness daily. The environmental temperature and humidity were maintained at 21±1°C and 70%, respectively. Rats were given *ad libitum* access to food and water.

Two weeks before analysis, progressive alopecia was observed in five-week-old Wistar albino rats at the Experimental Animal Production and Experimental Research Center of Mehmet Akif Ersoy University. Upon physical examination, alopecia was observed across the entire bodies of males and females without additional signs of disease. There was no previous history of alopecia. Skin scrapings and hair samples were collected in sterile sputum cups (FIRATMED, Turkey) from the various lesions on the bodies of three males and two females and immediately submitted to the Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology Laboratory in Burdur in July 2019 for analysis as shown in Figures 1 and 2.



Figure 1. *S. brevicaulis* lesions on the male rats.

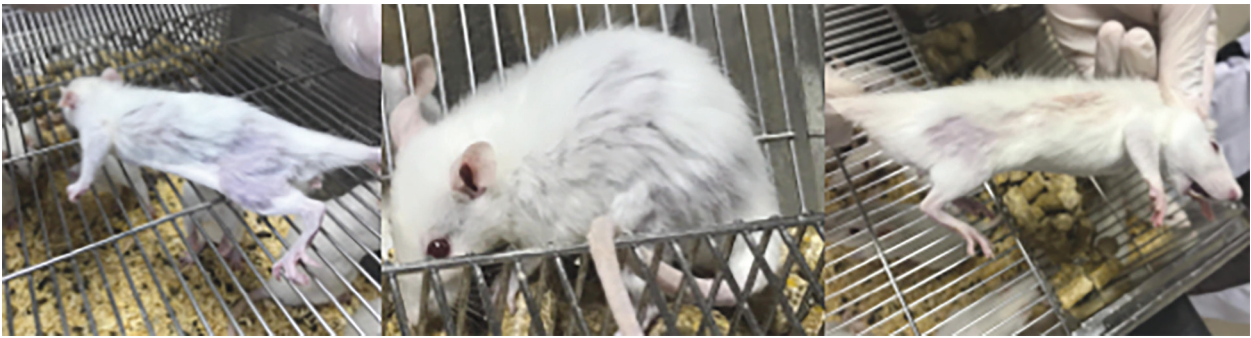


Figure 2. *S. brevicaulis* lesions on the female rats.

Isolation and Identification

For microbiological examination, part of the samples was processed in 10-20% potassium hydroxide (KOH) for 30 min and then examined by light microscopy using 400x magnification. The remaining samples were seeded on Sabouraud Dextrose agar (SDA, OXOID) plates supplemented with chloramphenicol (0.05 mg/mL) and separately incubated at 25°C and 37°C for 10 days. Plates were examined on a daily basis as previously described and isolated colonies were subsequently stained with lactophenol blue (Larone 1995). The isolated fungal colonies were stained with lactophenol blue and identified as *S. brevicularis* based on macroscopic and microscopic characteristics.

Results and Discussion

Breeding colonies of laboratory animals are of utmost importance in research for investigating a wide range of biomedical topics, such as understanding mechanisms of disease, developing dis-

ease prevention or treatment options, and evaluating health risks present in our living environment (Nicklas 2004). Although breeding conditions (e.g., diet, light conditions, bedding) for laboratory animals continue to improve, various infectious agents remain prevalent among colonies, especially fungal species (Park et al. 2006).

In this study, KOH preparations of skin scrapings and hair samples showed no hyphae. Identification of *S. brevicaulis* was confirmed by moderately fast growth at 25°C and poor growth at 37°C (Figure 3) with characteristic colonies' surface at first white, powdery and glabrous, and then becomes powdery light brown with a light tan periphery, and reverse was tan with the brownish center. Overall, microscopically showed hyaline or dematiaceous septate hyphae with annelids (brush-like groups form) that formed on a branched penicillin-bearing lemon-shaped conidia are shown in Figures 4 and 5.

There are limited data of clinical and experimental treatment of *S. brevicaulis* infections for

animals and humans, and even studies were reported that appropriate therapy for *Scopulariopsis* infections has yet to be defined (Aguilar et al. 1999; Cuenca-Estrella et al. 2006; Ozturk et al. 2009; Miossec et al. 2011). Despite the high antifungal resistance of *S. brevicularis*, researchers recommend all common antifungal agents such as amphotericin B (AMB) and voriconazole (VRC) (Cuenca-Estrella et al. 2006; Skóra et al. 2015). In this study, rats completely recovered without treatment and had no recurrence of clinical signs at one month post-sampling. It was thought that the cause of the total recovery of rats without any use of antifungal agent from opportunistic *S. brevicularis* infection was due to have no immune problems.

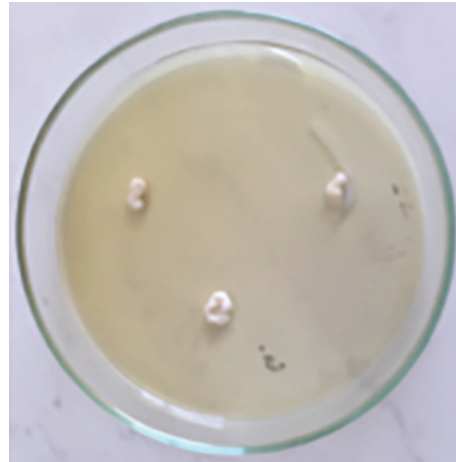


Figure 3. Macroscopic morphology of *S. brevicaulis* on SDA agar after 10 days at 37°C.

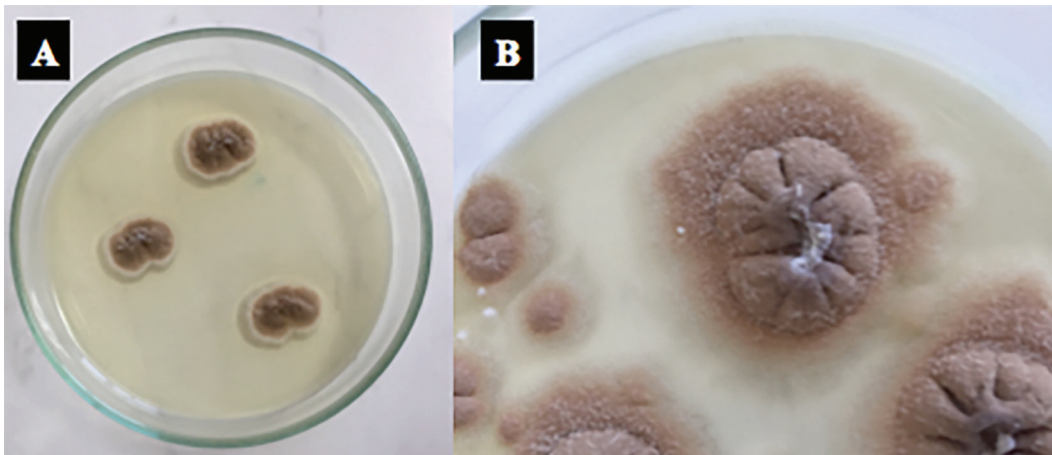


Figure 4. Macroscopic morphology of *S. brevicaulis* on SDA agar after 10 days at 25°C (A and B images).

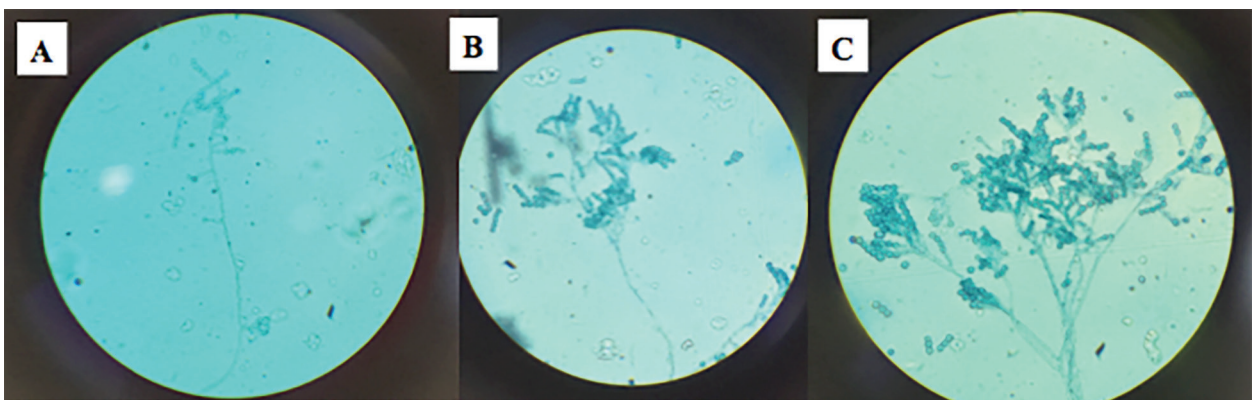


Figure 5. Branching and septated hyphae with conidiophores and conidia in chains seen on lactophenol cotton blue stain (A, B, and C images).

Scopulariopsis brevicularis cause invasive and non-invasive infections in animals and humans and unfortunately, there are no recommended therapies in previous researches (Bonifaz et al. 2007; Issakainen et al. 2007). The improper diagnostic methods and the high level of antifungal resistance (Aguilar et al. 1999; Sandoval et al. 2013; Skóra et al. 2015) may be responsible for the high mortality of *Scopulariopsis* infections (Issakainen et al. 2007). This case is the first to describe *S. brevicaulis* infection in Wistar rats from Turkey. Interestingly, *S. brevicaulis* was reported as an etiological agent of skin infections in two goats by Ozturk et al. (2009) in the same province. There have also been several previous reports of a high incidence of *S. brevicaulis* in humans and animals (dogs, cats, and large animals), which was unexpected (Romano et al. 2005; Costa et al. 2019; Sri-Jayantha et al. 2019). Moreover, the detection of this fungal agent in skin infections might be correlated with animal matter, such as hair, skin scales, sweat, and other organic material on the ground or wood shavings of cages. Mantovani et al. (1982) described this phenomenon as "animalization". Animal age, sex, and housing climate were found to be factors in previously described *S. brevicaulis* infections (Couto et al. 2014); however, these were not significant factors in this study.

Microbiological detection methods have been widely used to diagnose *Scopulariopsis* at the genus level, but maybe difficult for identifying species (Yang et al. 2012). Thus, distinctive features of *Scopulariopsis*, such as colony color and annellidic conidiogenesis, might be useful for identification (Samson et al. 2010).

This is the first report of *S. brevicaulis* infection in Wistar laboratory rats in Turkey in this study. This case may provide a guide for clinicians and microbiologists to diagnose unexpected fungal infections of laboratory animals. Additionally, ensuring strict control of hygiene for providing welfare to laboratory animals can help guarantee that they are protected well against infections.

Ethical approval and consent to participate:

Not applicable.

References

- Abbott SP, Sigler L, Currah RS. (1998) *Microascus brevicaulis* sp. nov., the teleomorph of *Scopulariopsis brevicaulis*, supports placement of *Scopulariopsis* with the Microascaceae. *Mycologia*. 90(2), 297-302. doi: 10.1080/00275514.1998.12026910
- Anandan V, Nayak V, Sundaram S, Srikanth P. (2008) An association of *Alternaria alternata* and *Scopulariopsis brevicaulis* in cutaneous phaeohyphomycosis. *Indian J. Dermatol Venereol Leprol*. 74(3), 244-247. doi: 10.4103/0378-6323.41371
- Aguilar C, Pujol I, Guarro J. (1999) In vitro antifungal susceptibilities of *Scopulariopsis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(6), 1520-1522.
- Bonifaz A, Cruz-Aguilar P, Ponce RM. (2007) Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. *Eur J Dermatol*. 17(1), 70 -72. doi: 10.1684/ejd.2007.0092
- Cawcutt K, Baddour LM, Burgess M. (2015) A case of *Scopulariopsis brevicaulis* endocarditis with mycotic aneurysm in an immunocompetent host. *Case Rep Med*. 2015871-872. doi: org/10.1155/2015/872871
- Costa FVA, Spanemberg A, Araujo R, Werner J, Ferreira L. (2019) Feline sino-orbital fungal infection caused by *Aspergillus* and *Scopulariopsis*. *Acta Sci Vet*. 47(Suppl 1), 383-341. doi: 10.22456/1679-9216.91581
- Couto MS, Pantoja LDM, Mourao CL, Paixao GC. (2014) Fungal microbiota of the hair coat of laboratory animals. *Rev Bras Vet*. 17(1), 52-54. doi: 10.4322/rbvc.2014.143
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Mellado E, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL. (2006) In vitro activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 50, 2248-2250. doi: 10.1128/AAC.00162-06
- Hampson ECGM, Gibson JS, Barot M, Shapter FM, Greer RM. (2019) Identification of bacteria and fungi sampled from the conjunctival surface of normal horses in South-East Queensland, Australia. *Vet Ophthalmol*. 22(3), 265-275. doi: 10.1111/vop.12587
- Issakainen J, Heikkilä H, Vainio E, Koukila-Kähkölä P, Castren M, Liimatainen O, Ojanen T, Koskela M, Meurman O. (2007) Occurrence of *Scopulariopsis* and *Scedosporium* in nails and keratinous skin. A 5-year retrospective multi-center study. *Med Mycol*. 45(3):201-209. doi: 10.1080/13693780601103080.
- Iwen P, Schutte SD, Florescu DF, Noel-Hurst RK, Sigler L. (2012) Invasive *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an immunocompromised patient and review of prior cases caused by *Scopulariopsis* and *Microascus* species. *J Mycol Med*. 50(6), 561-569. doi: 10.3109/13693786.2012.675629
- Kordalewska M, Jagielski T, Brillowska-Dabrowska A. (2016) Rapid assays for specific detection of fungiof *Scopulariopsis* and *microascus* genera and *Scopulariopsis brevicaulis* species. *Mycopathologia*. 181(7-8), 465-474. doi: 10.1007/s11046-016-0008-5
- Larone DH. (1995) *Medically important fungi: A guide to identification*. Fourth edition, American Society for Microbiology, USA, p. 272-274.
- Mantovani A, Morganti L, Batelli G, Mantovani A, Poqlayen G, Tampieri MP, Vecchi G. (1982) The role of wild animals in the ecology of dermatophytes and related fungi. *Folia Parasitol*. 29(3), 279-284.
- Miossec C, Morio F, Lepoivre T, Le Pape P, Garcia-Hermoso D, Gay-Andrieu F, Haloun A, Treilhaud M, Leclair F, Miegerville M. (2011) Fatal invasive infection with fungemia due to *Microascus cirrosus* after heart and lung transplantation in a patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 49(7), 2743-2747. doi: 10.1128/JCM.00127-11
- Nicklas W. (2004) *Infectious in laboratory animals: Importance and control*. Kaliste E. eds. *The Welfare of Laboratory Animals*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland. p. 153.
- Ozturk D, Adanır R, Turutoglu H. (2009) Superficial skin infection with *Scopulariopsis brevicaulis* in two goats. a case report. *Bull Vet Inst Pulawy*. 53, 361-363.

- Park J-H, Seok S, Baek M, Lee H, Kim D, Cho J, Kim C, Hwang D. (2006) Microbiological monitoring of guinea pigs reared conventionally at two breeding facilities in Korea. *Experimental Animal*. 55(5), 427-432. doi:10.1538/expanim.55.427
- Ragge N, Hart J, Easty D, Tyers A. (1990) A case of fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treatment with antifungal agent and penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 74(9), 561-562. doi: 10.1128/jcm.00127-11
- Romano C, Gianni C, Difonzo EM. (2005) Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. *Mycoses*. 48: 42-44. doi: 10.1111/j.1439-0507.2004.01066.x
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC. (2010) *Food and indoor fungi*. CBS Laboratory Manual Series 2. CBS-Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Fothergill AW, Cano-Lira J, Gené J, Decock CA, de Hoog GS, Guarro J. (2013) *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and *in vitro* responses to antifungal drugs. *J Clin Microbiol*. 51(12), 3937-3943. doi: 10.1128/JM.01927-13
- Skóra M, Bulanda M, Jagielski T. (2015) *In vitro* activities of a wide panel of antifungal drugs against various *Scopulariopsis* and *Microascus* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 59, 5827-5829. doi: 10.1128 /AAC.00978-15
- Sri-Jayantha L, Matthews KG, Scharf V. (2019) *Scopulariopsis brevicaulis* rhinosinal infection in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 55: e55102. doi: 10.5326/jaaha-ms-6869
- Tosti A, Piraccini BM, Stinchi C, Lorenzi S. (1996) Onychomycosis due to *Scopulariopsis brevicaulis*: clinical features and response to systemic antifungals. *Br J Dermatol*. 135(5), 799-802. doi: 10.1111/j.1365-2133.1996.tb03895.x
- Yang Q, Wei J, Chen Z. (2012) Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute monocytic leukemia patient. *Diag Microbiol Infect Dis*. 73(4), 369-371. doi: 10.1016/j.diag-microbio. 2012.04.010



Veteriner tıbbi ürünlerde safsızlıklar

Mustafa Kesmen¹ , Tülay Bakirel²

¹ *İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü İlaç Kalite Kontrol Laboratuvarı, Pendik, İstanbul-Türkiye*

² *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Büyükçekmece, İstanbul-Türkiye*

Geliş Tarihi / Received: 22.06.2020, **Kabul tarihi** / Accepted: 26.10.2020

Özet: Tıbbi ürünlerin içermiş oldukları arzu edilmeyen bileşenlerin belirlenmesi, farmasötik kalitenin teminatı açısından bir ön koşuldur. Tıbbi ürünlerde etkin madde ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olan safsızlıkların kontrolü ise bu güvencenin en kritik ve kompleks parametrelerinden birisidir. Farklı başlangıç materyalleri kullanılarak farklı formülasyonlarla geliştirilen ürünlerde bu parametrenin çeşitliliği, kontrolünün zorluğunu ve beraberinde getirdiği riskleri daha da artmaktadır. Veteriner tıbbi ürünlerin kapsamı tür çeşitliliği, hedef hayvan güvenliği, tüketici güvenliği, gıda güvenliği, kullanıcı güvenliği, çevresel güvenilirlik ve antimikrobiyel direnç yönleriyle beşeri tıbbi ürünlere göre daha geniştir. İlaç ürününün her hangi bir dozaj biriminin aynı miktarda aktif bileşen vermesi ve mümkün olduğunca safsızlık içermemesi amacıyla kalite kontrol uygulamaları kapsamında gerçekleştirilen safsızlık kontrolleri ve bu konudaki mevzuatlar oldukça karmaşıktır. İlaç üreticisinden tüketicisine kadar geniş bir kitleyi ilgilendiren safsızlık konusunun ele alındığı bu derlemede; safsızlıkların kontrolü ve önlenmesine yönelik rasyonel öneriler sunulmaya çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Degradasyon, farmasötik kalite, mutajenite, safsızlık, veteriner tıbbi ürün.

Impurities in veterinary medicinal products

Abstract: Identification of undesirable components contained in Medicinal Products is a prerequisite for the assurance of pharmaceutical quality. Control of impurities, which are any components other than active substances and excipients in medicinal products, is one of the most critical and complex parameters of this assurance. The variety of this parameter in products developed with different formulations using different starting materials, the difficulty of its control, and the accompanying risks increase even more. The scope of veterinary medicinal products is wider than human medicinal products in terms of species differences, target animal safety, public health, food safety, user safety, environmental safety, and antimicrobial resistance. Impurity controls and regulations on this matter are very complex to ensure that any dosage unit of the drug product gives the same amount of active ingredient and does not contain impurities as much as possible. In this review, the issue of impurity, which concerns a wide audience from the pharmaceutical manufacturer to the consumer, is discussed; It has been tried to present rational suggestions to prevent and control of these impurities.

Keywords: Degradation, impurity, mutagenicity, pharmaceutical quality, veterinary medicinal products.

Giriş

Veteriner ilaç endüstrisi; Veteriner Hekimlikte tedavi edici, koruyucu, besleyici ve tanı amaçlı kullanılmak üzere, ilaç etkin ve yardımcı maddelerinden farmasötik teknolojiye uygun olarak tıbbi ürünler üreten ve sağlık hizmetlerine sunan bir sanayidir. Sağlık ve tedaviye yönelik hizmetleri ile stratejik bir rol üstlenen bu endüstride, Veteriner tıbbi ürünün piyasaya arzı öncesinde etkinlik, güvenilirlik ve farmasötik kalitenin güvence altına alınması bir zorunluluktur (DPT 2007; Anonim, 2011; Anonim, 2012a). Ürün kalitesinin yaşamsal öneme sahip olduğu ve sürekli olarak istenilen kalitede ürün üretebilme becerisinin vazgeçilmez olduğu bu endüstride, tıbbi ürünlerin hedeflenen kalitede üretiminin güvence altına alınması ise resmi otoriteler tarafından yayımlanan dü-

zenlemeler ve gerçekleştirilen denetimler ile sağlanabilmektedir (Mike ve ark. 2014).

Hedef canlı türü ve halk sağlığı açısından önem arz eden tıbbi ürünlerin standardizasyonuna ilişkin kritik düzenlemelerin tarihçesine kısaca bakıldığında; Avrupada'ki ilk farmakopenin İspanya'da (1581) yayımlanmasından 1938 yılına kadar piyasaya giriş öncesi ilaçlar için herhangi bir güvenilirlik testinin yapılmadığı belirlenmiştir. İlk düzenleme, sülfanilamid eliksir isimli üründe çözücü olarak kullanılan dietilen glikol'un ölümlere neden olduğunun saptanması ile gündeme gelmiş ve 1938 yılında tıbbi ürünlere piyasaya sürülme öncesi bildirim zorunluluğu getirilmiştir (Rägo ve Santoso 2008). Çeşitli ülkelerde 1958-1960 yılları arasında piyasaya sürülen talidomidin 10.000 bebeğin fokomeli ve diğer deformitelerinin

den sorumlu olduğunun hükmü ile ilaç güvenilirlik çalışmalarında milat niteliğinde olan düzenlemeler yeniden şekillendirilmeye başlanmıştır. 1962 yılında Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (U.S.Food and Drug Administration [FDA]) yeni ilaçların etkinlik ve güvenilirliğini kanıtlamasının gerekliliğine yönelik yasayı onaylamıştır. Benzer şekilde Avrupa Birliği'nde (AB) ilaçlara yönelik ilk düzenleme 1965 yılında 65/65/EEC sayılı direktif ile hayata geçirilmiş, bu direktif ile kamu sağlığının yüksek düzeyde korunmasının sağlanması ve sürdürülmesi amaçlanmıştır. Özellikle 1968 yılında talidomidin (R)-enantiyomerinin sedatif, (S)-enantiyomerinin ise teratojenik etkili olduğunun ispatlanması ile birçok ilaç etkin maddesinin kiral olduğu ve biyolojik etkilerinin farklılık gösterebileceği gerçeğine dayanarak 1993 yılında kiral etkin maddelerin araştırılmasına ilişkin kılavuz yayımlanmıştır. Bu kılavuz ile stereokimyasal olarak tanımlanmış aktif maddelerin incelenmesinin yolu açılmış ve yeni aktif maddelere stereojenik merkezler ile kiralite açısından kontrol zorunluluğu getirilmiştir (EMA 1993). AB Komisyonu 2001 yılında ilaçlara ilişkin yasal düzenlemelerin kapsamını genişleterek hayvan sağlığının daha iyi korunmasını sağlamaya yönelik veteriner ilaçları için de bir direktif yayımlamıştır. Günümüze değin AB'de beşeri ve veteriner ilaçların güvenilirliği ile kalitede standardizasyonunu sağlamaya yönelik bir çok düzenleme yapılarak uygulamaya geçirilmiştir. (DPT 2005; Răgo ve Santoso 2008; Smith, 2009; ACS 2014; Vargesson 2015).

Teknolojik ilerlemelere paralel bir şekilde her geçen gün artan sayıda yeni ilaç etkin maddelerinin ve tedavi alternatiflerinin çeşitlenip gelişimi, bazı uluslararası referans kuruluşlarca oluşturulan, tıbbi ürünlerde güvenilirlik konusunda bilimsel temele dayalı standartların güncellenmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu doğrultuda FDA, EMA gibi referans organizasyonların yanı sıra günümüzde Avrupa Birliği, Japonya ve ABD'nin ortaklığıyla kurulmuş olan Uluslararası Beşeri Kullanıma Yönelik Farmasötiklerin Teknik Gerekliliklerini Uyumlaştırma Konseyi (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use-ICH) ve Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Teknik Gerekliliklerin Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products-VICH) tıbbi ürünlerde uluslararası standardizasyonu geliştirmek için işbirliğine devam etmektedirler (ICH 1990; VICH 1993). Belirli dönemlerde yayımlanan kılavuzlarda farmasötik ürünlere ait güvenilirlik uygulamalarının nasıl yürütüleceği; etkin maddenin sentezinden başlayıp en son ulaştığı

perakende satış yerleri, hatta gıdalarda ilaç kalıntısı olarak tüketiciye ulaşana kadar geçen süreci kapsayacak şekilde sunulmakta ve zaman zaman revize edilmektedir (Anonim 2012a; Erkeoğlu ve ark. 2014).

Ülkemizde veteriner tıbbi ürünlerin üretimi, ithalatı, ihracatı, kullanımı, reçeteli ya da reçetesiz satışı, izin, kontrol ve teminine ilişkin uygulamaların belirlenmesine yönelik otorite Tarım ve Orman Bakanlığı'dır. Ülkemizde henüz yeni geliştirilen molekül bulunmaması nedeniyle veteriner tıbbi ürünlere ait izin sürecinde, etkisi iyi bilinen ve güvenilirlik seviyesi kabul edilebilir ürünler için güvenilirlik ve etkinliğine dair detaylı bir bibliyografya ile farmasötik kalite çalışmalarının yanı sıra idari bilgi ve belgelerin sunulması yeterli görmektedir. Ancak Tarım ve Orman Bakanlığı'nca yayımlanan kılavuzlarda ruhsatlandırmaya ilişkin net hükümlerin bulunmaması durumunda; Avrupa Birliği, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Farmasötik Denetim Sözleşmesi (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme [PIC/S]), VICH ve ICH gibi kurum ve kuruluşların kılavuzları dikkate alınmaktadır (Anonim 2011a; Anonim 2012a).

Ürünlerin kalitesinin, dolayısıyla etkinliği ve güvenilirliğinin güvence altına alınmasının esas olduğu ulusal ve uluslararası düzenlemelere göre pazarlama izin sürecinde, İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practices-GMP) ilkeleri doğrultusunda formülün gelişimi, proses validasyonu, proses içi kontroller, başlangıç maddelerinin kontrolü ve stabilize çalışmaları yürütülmektedir (Anonim 2011a; Anonim 2012b; Anonim 2015). Mevcut çalışmalar sonucunda ise başlangıç materyali/ürünün kalitatif ve/veya kantitatif özellikleri ile uyması gereken test prosedürleri ve kabul limitlerini içeren spesifikasyonlar belirlenmektedir. Bu spesifikasyonlar, etkin madde, farmasötik form, uygulama yolu gibi kriterler esas alınarak, farmakope monografileri ve ilişkili kılavuzlara göre ürüne özgü fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kalite özellikleri doğrultusunda oluşturulmaktadır. (EMA 1991; VICH 2005). Spesifikasyonlar organik, inorganik ve çözücü kalıntısı safsızlıklara ilişkin kontrolleri de kapsar (Anonim 2012a). Spesifikasyonlardaki tanıma, miktar tayini ve safsızlık kontrolleri her ürün için evrenseldir. Ürünün saflık kontrolleri; hedef hayvan türünde etkinliğin güvence altına alınmasını, safsızlıkların kontrolü ise ürünün hedef hayvan ve tüketici yönünden güvenilirliğinin garanti altına alınmasını hedeflemektedir (EMA 1991). Pazarlama izin başvurularında fiziko-kimyasal metotlar ürünün kalitesine ilişkin yeterli bilgi sağlayamıyorsa, in vivo ya da in vitro tayin metotları sunulur. Avrupa Farmakopesi ya da AB üyesi ülke farmakopesi monografinin

da yer alan spesifikasyonun, maddenin kalitesini garanti etmeye yetmemesi durumunda, spesifik safsızlıklara ait limitler de dahil olmak üzere daha uygun spesifikasyonlar istenebilmektedir (Anonim 2012a).

Tıbbi ürünlerde etkin ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olarak tanımlanan safsızlıklar, hiçbir yarar sağlamadan sadece risk oluşturan kimyasallar niteliğindedir. Küçük miktarlarda dahi farmasötik ürünün etkinliği ve güvenilirliğini etkileyebilen bu bileşenler; sentez yöntemi, yetersiz saflaştırma, başlangıç maddelerinin kalitesi, formülasyon, bozunma ve bileşenler arası ortak etkileşim gibi birçok kaynaktan oluşabilmektedir. Çeşitlerine, artan sayı ve konsantrasyonlarına bağlı olarak tıbbi ürünün risk potansiyelini artıran safsızlıkların, ürünün piyasaya sürülmeden önceki süreçte nicelik ve niteliklerinin belirlenmesi bir zorunluluktur (VICH 2007a, 2007b; Jacobson-Kram ve McGovern 2007, Erkeoğlu ve ark. 2014). Buna ek olarak mevcut/bilinen aktif maddeleri içeren tıbbi ürünlerin kalitesinin değerlendirilmesi hakkında EMA tarafından yayımlanan bildirimde; orijinal ve jenerik ürünlerdeki safsızlıklar ve kullanılan yardımcı maddelerdeki farklılıkların, güvenilirlik ve etkinlik yönünden önemli farklılıkları başlatmaması gerektiği bildirilmekte olup, güvenilirlik yönünden önemli derecede fark olması durumunda biyoeşdeğerlikten bahsedilemeyeceği bilgisine yer verilmektedir. Dolayısı ile pazar hacminin önemli bir bölümünü oluşturan jenerik ürünlerin pazarlama öncesi süreçte safsızlık profillerinin, kalite, etkinlik ve güvenilirliğin bir göstergesi olarak tanımlanması önem arz etmektedir (EMA 2008).

Veteriner tıbbi ürünlerin kalite hedeflerine ulaşma sürecinde kritik kalite kontrol standartlarına uygun spesifikasyonlar kapsamında safsızlığa ilişkin kontroller yer almakta ve belirlenen safsızlık profillerinin, ürünün piyasaya sürülmesi sonrası süreçte de izlenmesi gerekmektedir (VICH 2005; Anonim 2012a). Bu doğrultuda VICH tarafından 2007 yılında yayımlanmış olan (VICH GL10 ve VICH GL11) veteriner ilaç madde ve tıbbi ürünlerine yönelik safsızlık rehberlerinde safsızlıklara yönelik karar mekanizmasında izlenecek yollar hakkında bilgiler sunulmaktadır. Veteriner tıbbi ürünlerde, çözücü kalıntısı safsızlıklarına dair kılavuz ise 2012 yılında uygulamaya girmiştir (VICH 2011). Ayrıca, 2017 yılında yayımlanan element safsızlıkları kılavuzlarıyla birlikte (EMA 2017), Veteriner tıbbi ürünlerde DNA reaktif (mutajenik) safsızlıkların kontrolü ve değerlendirmesine yönelik kılavuz, EMA tarafından 2018 yılında yayımlanmış olup adaptasyon süreci başlatılmıştır. Hedef hayvan türünün güvenliği perspektifiyle hazırlanan DNA reaktif safsızlıklar kılavuzu ile

hayat boyu 100.000'de 1 kanser riski temel alınarak mutajenik safsızlıkların kontrolü için sınırlamalar getirilmiştir (EMA 2018b).

Veteriner tıbbi ürünler; hayvan sağlığı ve refahı üzerinde direk, gıda güvenliği ve çevre üzerindeki dolaylı etkileri nedeniyle tek sağlık kavramının vazgeçilmez unsurlarıdır (Bakirel 2020). Dolayısıyla bu ürünlerin etkinlik ve güvenilirliğine ilişkin laboratuvar ve klinik çalışmaların belgelenmelerinin yanı sıra, üretimlerinden tüketime sunulacağı sürece kadar farmasötik kalitesinin güvence altına alınması önemli bir husustur. Bu kapsamda ilgili derlemede; Veteriner tıbbi ürünlerdeki organik ve DNA reaktif safsızlıklar, çeşitli boyutları ile ele alınmaya ve safsızlıkların kontrolüne yönelik rasyonel öneriler sunulmaya çalışılmıştır.

Safsızlıklar

Veteriner Tıbbi Ürünlerde Safsızlıklar

İlaç maddelerinde etkin maddeler, ilaç ürünlerinde ise etkin ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olarak tanımlanan safsızlıklar, ilaçların güvenilirliği konusunda problem yaratan istenmeyen kimyasallar niteliğindedir (Erkeoğlu ve ark. 2014). ICH ve VICH'e göre ilaç maddelerinin safsızlıkları; üretim prosesiyle ilişkili olanlar, degradasyonla ilişkili olanlar, kalıntı solventleri ve ağır metaller olarak sınıflandırılmaktadır (Liu ve Chen 2019). Benzer şekilde, VICH GL10 ve GL11 kılavuzlarında veteriner ilaç safsızlıkları; organik, inorganik ve kalıntı solventleri şeklinde kategorize edilmektedir. İlaç maddelerinin üretim proses ve/veya depolanma süreçlerinde açığa çıkabilen organik safsızlar; tanımlanabilir veya tanımlanamaz, uçucu veya uçucu olmayan nitelikte olabilirler. Üretim prosesinden kaynaklanan inorganik safsızlıklar kapsamında ise reaktifler, ligandlar, katalizörler, ağır metaller, diğer artık metaller, inorganik tuzlar ve diğer malzemeler (filtre yardımcıları gibi) bulunabilir. Çözücüler, ilaç maddesinin sentezinde çözücülerin veya süspansiyonların hazırlanması için bir araç olarak kullanılan inorganik veya organik sıvılardır. İlaç maddelerinin üretim prosesinde kullanılan çözücü kalıntılarının kontrolü VICH GL18 kılavuzuna göre gerçekleştirilir (VICH 2007a, 2007b, 2011).

Uluslararası düzenleyici kuruluşlar veteriner tıbbi ürünlerde olası safsızlıkların kontrolüne ilişkin çeşitli kılavuzlar yayımlamıştır. Bu doğrultuda; VICH GL11 kılavuzunda veteriner tıbbi ürün safsızlıkları; etkin maddeden kaynaklanan safsızlıklar, yardımcı maddelerden kaynaklı safsızlıklar, ekstrakte edilebilir-sızabilir safsızlıklar ile degradasyon ürünleri-

ni kapsayacak şekilde değerlendirilmektedir (VICH 2007a, 2007b). İlave olarak EMA tarafından 2018 yılında yayımlanan “*Veteriner Tıbbi Ürünlerde DNA Reaktif (Mutajenik) Safsızlıkların Kontrolü ve Değerlendirilmesine Yönelik Kılavuz*” ile safsızlıkların kontrolüne ilişkin mekanizmanın kapsamı genişletilmiştir. Bu kılavuzda daha düşük dozlarda daha yüksek toksisiteye sahip, DNA hasarı oluşturma potansiyeli olan DNA reaktif safsızlıkların; başlangıç materyali kaynaklı, etkin madde-yardımcı madde-kap/kapak sistemi etkileşimi kaynaklı oluşabileceği gibi degradasyon ürünü olarak da meydana gelebileceği belirtilmektedir (EMA 2018b). Benzer şekilde tıbbi ürünlerde kristalizasyonla ilişkili (polimorfik formlar) ve stereokimya ilişkili safsızlıklar (stereoizomer, diastereoizomer, epimer, cis/trans safsızlıkları) ile yabancı kontaminantların da son üründe bulunabileceği bildirilmektedir (VICH 2007a, 2007b; Tian ve ark 2015; EMA 1993, 2018b).

Yukarıda yer alan bilgilerden de anlaşılacağı üzere farklı yıllarda yayımlanan kılavuzlarda safsızlıklar konusu çeşitli boyutlarıyla ele alınmış olup tüm kılavuzlar için tek tip bir sınıflandırmanın yapılması olanaksızdır. Bu yaklaşımla veteriner tıbbi ürünlere ilişkin safsızlıklar; ürün kalitesini, dolayısıyla etkinliği ve güvenilirliğini güvence altına alan ve her ürüne ait spesifikasyonda yer alan organik safsızlıklar ile birlikte, 2020 yılında uygulamaya giren DNA reaktif safsızlıklar olarak ele alınmış, tıbbi ürünlerde potansiyel safsızlıklar Şekil 1’de özetlenmiştir.

1. Organik Safsızlıklar

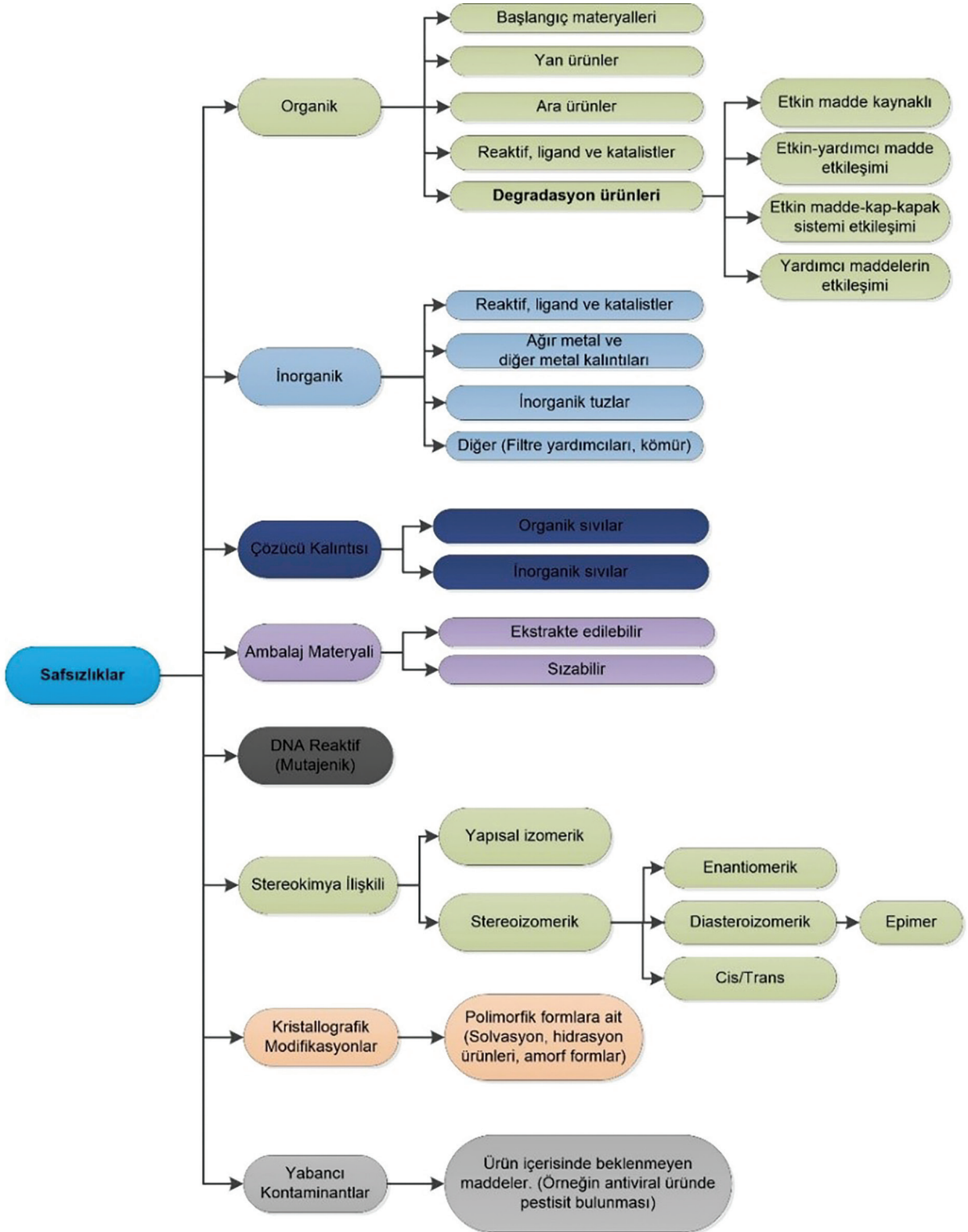
Organik safsızlıklar, ilaç maddesinin üretimi veya depolanması sırasında ortaya çıkabilirler. Dolayısıyla kimyasal sentez ve devamında degradasyonun sonucu olarak safsızlıklar tüm başlangıç materyali ve ilişkili tıbbi ürünlerde bulunabilir. Organik safsızlıkların kapsamında; ilaç maddesinin sentezinde kullanılan başlangıç materyalleri, ilaç maddesinin sentezi için gerekli olan ara ürün, beklenmeyen yan ürün ve degradasyon (bozunma) ürünleri ile reaktifler, ligandlar ve katalizörler yer alabilir (VICH 2007a).

Degradasyon ürünleri; ambalaj materyali veya yardımcı maddeler ile reaksiyon, pH, su, ışık, sıcaklık gibi değişimlerin etkisi aracılığıyla etkin maddelerin ve ürünlerin depolanması ve üretimi süresince oluşan kimyasal değişikliklerden kaynaklanan safsızlıklar olarak nitelendirilmektedir (VICH 2007a, 2007b). Özellikle farmasötik ürünlerin bileşiminde yer alan yardımcı maddelerde şekillenebilen reaktif safsızlıklar, tıbbi ürünler için kayda değer degradasyon kay-

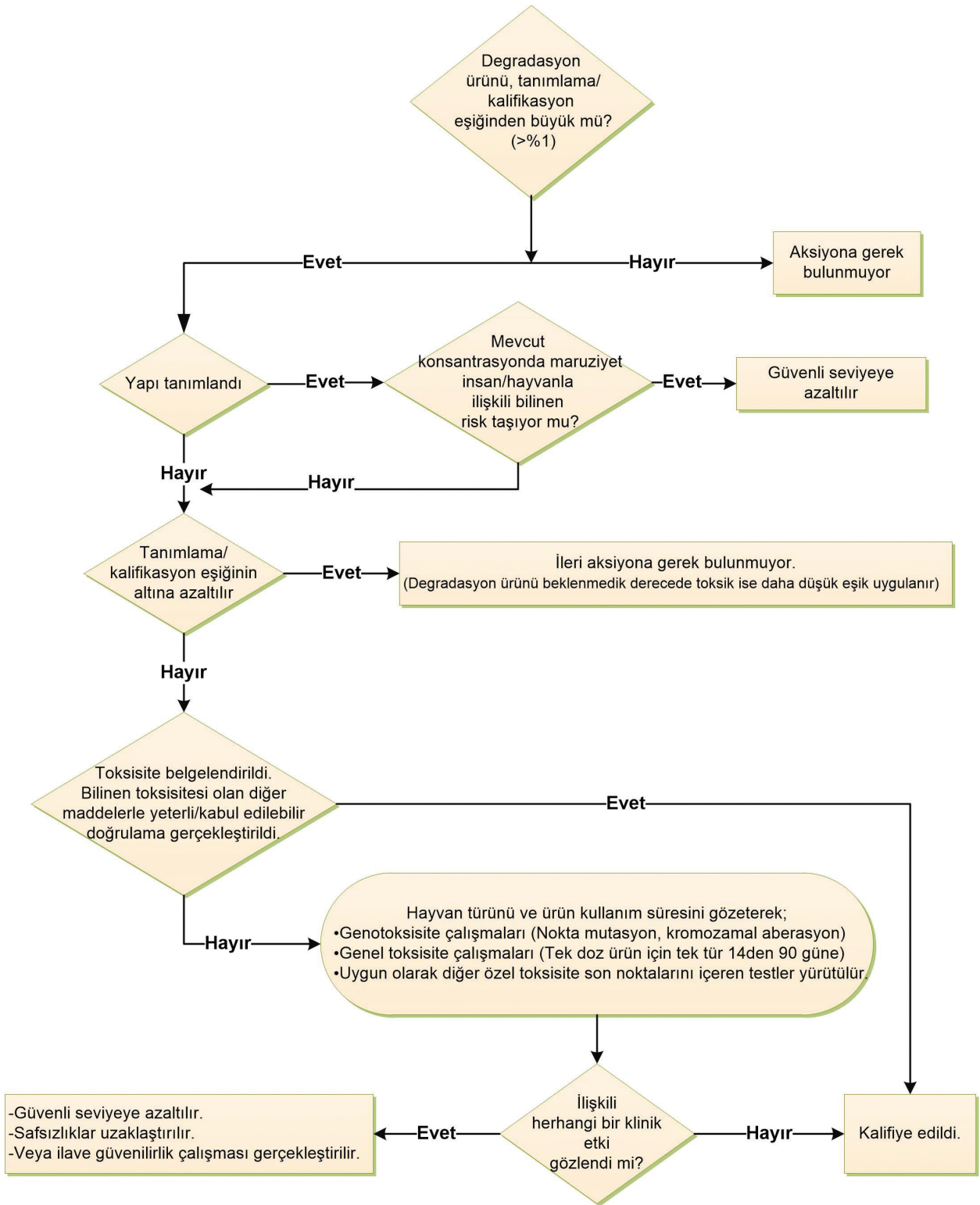
nağı olarak görülmektedir (Wu 2011, Elder ve ark. 2016). Dolayısıyla bu degradasyon ürünleri formülasyonun kalite, etkinlik ve güvenilirliğini değiştirebilme potansiyeline sahiptir (Pindelska ve ark. 2017). Avrupa Komisyonu’nun EC 470/2009 sayılı düzenlemesinde farmakolojik olarak aktif maddelerin tanımında; hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan etkin madde, yardımcı maddeler, degradasyon ürünleri ve onların metabolitleri arasında ayırım yapılmamakta olup (Anonim 2009), FDA veri tabanında; belirli dozaj formu ve potens için onaylanan konsantrasyon ve formda inaktif olduğu kabul edilen yardımcı maddelere ilişkin bilgiler yer almaktadır (FDA 2020).

Tıbbi ürünlerde organik safsızlıklar için belirlenen limitler; degradasyon ürünü olarak tanımlanan etkin madde-yardımcı madde reaksiyon ürünleri, etkin madde-ambalaj materyali reaksiyon ürünleri ve etkin maddelerin degradasyon ürünlerini kapsar (VICH 2007b). Degradasyon yolak bilgisi, ürün geliştirme ve laboratuvar çalışmaları, önerilen muhafaza koşullarında yürütülen uzun dönem, ara koşul, hızlandırılmış ve in-use (kullanım) stabilite çalışmaları sayesinde ürünün degradasyon profili karakterize edilir. Sıcaklık, nem, oksidasyon, hidroliz gibi koşulların etkilerinin gözlemlendiği stres testleri, potansiyel degradasyon ürünlerini göstermek için yardımcı ve gereklidir (EMA 2007c, 2008).

Son üründe % 0,3 üzerindeki degradasyon ürünü safsızlıklar bir kod numarası veya alıkonma zamanı gibi uygun bir tanımlayıcı ile raporlanırken % 1 üzerindeki degradasyon ürünlerinin tanımlanması zorunludur. % 1 altındaki degradasyon ürünlerinin tanımlanmasına gerek bulunmamakla birlikte beklenmedik derecede potent, kayda değer farmakolojik veya toksik etki üretme potansiyelinden şüphelenilen degradasyon ürünleri için analitik metotlar geliştirilir ve özel eşik değerler göz önünde bulundurulur. % 1 üzerindeki degradasyon ürünleri için kalifikasyon limiti uygulanmaktadır. Bu limiti aşan degradasyon ürünü safsızlıklar, klinik ve güvenilirlik çalışmalarında güvenli bulunan dozun altında ise kalifikasyonu yapılmış kabul edilir. Daha düşük ve daha yüksek kalifikasyon limitleri için vaka bazlı alternatif değerlendirme yapılır. Güvenilirlik verisi bulunmayan degradasyon ürünü safsızlıklar için yapının tanımlanması ile hedef hayvana özgü genel ve özel toksisite bilgilerinin sunulması gerekmektedir. Degradasyon ürünlerinin tanımlanması ve kalifikasyonu için karar ağacı Şekil 2’de verilmiştir (VICH 2007b).



Şekil 1. Tıbbi Ürünlerde Potansiyel Safsızlıklar (VICH 2007a, 2007b; Tian ve ark. 2015; EMA 1993, 2018b)



Şekil 2. Degradasyon Ürünlerinin Tanımlanması ve Kalifikasyonu için Karar Ağacı (VICH 2007b).

Günümüze değin etkin madde kaynaklı safsızlıklara dair birçok veri bilimsel literatüre aktarılmıştır. 2015-2017 yılları arasında Avrupa Birliği'nde gentamisin enjeksiyonluk çözeltisinin atlarda kullanımı sonucu, 9'u ölümlle sonuçlanan, anafilaktik tip reaksiyon olarak 154 istenmeyen etkinin rapor edilmesi bunlardan birisidir. Çeşitli analizler doğrultusunda, gentamisin içeren ürünlerin aynı üreticiye ait etkin madde serilerinde histamin kalıntıları bulunmuştur. İleri kontroller ile, yüksek düzeyde histamin safsızlığının, etkin maddenin uygun olmayan koşullarda muhafazasından kaynaklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (EMA 2018a).

1.1. Yardımcı Madde Seçiminin Ürün Güvenilirliği Yönünden Önemi

Avrupa İlaç Ajansı tarafından; veteriner tıbbi ürünlerde jenerik ürünler için referans ürüne karşı risk/fayda değerlendirmesinde biyoeşdeğerliğin ana ilke olduğu vurgulanmaktadır. Bu kapsamda; orijinal ve jenerik ürünler arasında risk/fayda dengesinin benzer olduğunun göz önünde bulundurulduğu belirtilmekle birlikte istisnai koşullarda bu dengenin kısmi olarak yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir. Özellikle yeni bir yardımcı madde kullanımının, yeni toksisite bilgilerine neden olabileceği hususuna dikkat çekilmiştir (EMA 2009).

Beşeri tıbbi ürünlere göre hedef hayvan güvenliği, tüketici güvenliği, kullanıcı güvenliği, çevresel güvenilirlik ve antimikrobiyal direnç yönleriyle veteriner tıbbi ürünlerin risk değerlendirmesi daha fazla çeşitliliği barındırmaktadır (EMA 2007b). Bu doğrultuda; veteriner tıbbi ürün izin başvurularında VICH GL6 ve GL38 kılavuzları ile birlikte kimyasalların kayıt, değerlendirme, izin ve kısıtlamalarını düzenleyen, REACH olarak isimlendirilen (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) düzenlemelerin takip edilmesi gereklidir (EMA 2015).

Veteriner tıbbi ürünlere ilişkin kılavuzlarda yardımcı maddelerin toksisite potansiyeline ilişkin kapsamlı atıflara yer verilmemesine rağmen, beşeri tıbbi ürünlerde kullanılan karsinogenik, mutajenik ve reprotoksik potansiyeli olan (Carcinogens, Mutagens, Reprotoxic-[CMR]) yardımcı maddelerin tespiti durumunda, yerine başka maddelerin kullanımı önerilmektedir. Herhangi bir yardımcı maddenin bir etkin madde veya yeni bir uygulama şekli ile ilk kez kullanılacak olması durumunda ise etkin madde formatında değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle, farmakokinetik ve farmakodinamik etkileri olan yardımcı maddelerin bitmiş ürün formülasyonu üzerinden güvenilirlik değerlendirmesinin yapılması

öngörülmektedir. Yardımcı maddelerin her zaman mümkün olan en düşük miktarda kullanılması önerilmekle birlikte, bilinen yardımcı maddenin yeni bir uygulama yolunda kullanıldığında beklenmeyen reaksiyonlar gözlemlenebileceği de gözardı edilmemelidir. Standart yardımcı madde, bilinen bağlamdan daha yüksek konsantrasyonda kullanıldığında ise güvenilirlik yönüyle değerlendirilmelidir (EMA 2007a).

2. DNA Reaktif Safsızlıklar

Tıbbi ürünlerin mutajenik ve genotoksik yönlerinin araştırılması, meydana gelebilecek risklerin kabul edilir düzeye indirilerek güvenilirliğinin değerlendirilmesi son derece önemlidir (Ziegelbauer ve ark. 2009). İlaçların çoğunluğu; hidrolize olabilen su, küçük miktarda elektrofil ve oksidasyonu katalizleyen metaller gibi reaktif türler içerebilmektedir (Pilaniya ve ark. 2010). Kimyasal tepkime sonucu DNA hasarını indükleme potansiyeli bulunan maddeler, DNA reaktifler olarak tanımlanmakta olup, bakteri ters mutasyon testi (AMES) gibi uygun test yöntemleriyle mutajenik potansiyeli gösterilen safsızlıklar, DNA reaktif (Mutajenik) safsızlık olarak isimlendirilmektedir. Tıbbi ürünlerde saptanmaları durumunda ise düzeylerinin toksikolojik kaygı eşiğinin altına indirilmesi gerekmektedir (EMA 2018b).

Safsızlıkların değerlendirilmesinde, ilk aşama olan yapı-aktivite ilişkisinin aydınlatılması faydalı bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bu amaçla kullanılan *in silico* yöntemler hayvan deneylerine alternatif olarak, veri boşluklarını doldurmak ve kimyasalların yönetimini geliştirmek için kabul edilebilir hale gelmiştir. Kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (Quantitative Structure Activity Relationship [QSAR]) prensipleri doğrultusunda, kimyasal bir yapının nitelikleri ve biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkiler, fizikokimyasal özellikleri arasındaki ilişkiler ile kimyasalların çevresel ve toksikolojik davranışlarının irdelenmesi mümkün olabilmektedir (Plošnik ve ark. 2016; Akı-Yalçın 2017). Değerlendirmenin ikinci aşamasında genotoksisite testleri ön plana çıkmaktadır. Bu testler ile DNA'da oluşan, geri dönüşümlü birincil hasarların ölçümü, geri dönüşümsüz hasarlara neden olarak germ hücrelerinde meydana geldiğinde sonraki jenerasyonlara aktarılabilen gen mutasyonları ile yapısal ve sayısal kromozom anomalileri saptanabilmektedir (VICH 2014; OECD 2015). Yapısında uyarıcı grup içeren, etkin madde yapısından farklı ve mutajenite verisi bulunmayan safsızlıklar için AMES testi uygulanır. Üreticiler tarafından bu çalışmaların İyi Laboratuvar Uygulamaları (Good Laboratory Practices [GLP]) koşullarında gerçekleştirilmesi beklenmekte

olup, GLP uyumlu olmadığı durumlarda çalışma raporunda sapma olarak tanımlanması, safsızlıkların sentezinin veya elde edilmesinin gerçekleştirilebilir olmadığı durumlarda ise minyatür formatta AMES testinin yürütülebileceği bildirilmiştir (EMA 2018b). Bununla birlikte, minyatür AMES testinde 300 mg kadar test maddesi gerekmektedir (Flamand ve ark. 2001).

Veteriner Tıbbi Ürün Safsızlıklarının Önlenmesine Yönelik Öneriler

Farklı formülasyonlar ve üretim prosesleri ile günden güne artarak çeşitlenen ve veteriner tıbbi ürünlerin yaşam döngülerinin farklı evrelerinde saptanabilen safsızlıkların kontrolü, hayvan ve halk sağlığının korunması açısından önemli bir konudur. Dolayısıyla etkin maddenin eldesinden tıbbi ürünlerin tüketimini kapsayan bu süreçte, düzenleyici otoriteden kullanıcıya kadar geniş bir yelpazede sorumluluklar düşmektedir.

Bu derlemede yararlanılan kaynaklar ve safsızlıklara ilişkin tez projem doğrultusunda, veteriner tıbbi ürünlerin etkinlik ve güvenilirliğine yönelik olumsuz etkileri olan safsızlıkların kontrol altına alınmasında etkili olabilecek çözüm önerileri ise aşağıda sunulan maddeler halinde özetlenebilir.

A. Safsızlıkların nitelik/niceliklerinin etkin bir şekilde saptanabilmesi ve olası etkilerinin rasyonel bir şekilde değerlendirilebilmesi için;

a) İyi Laboratuvar Uygulamaları sertifikasyonuna sahip, molekül sentezi ve saflaştırmasından hücre kültürü ve toksisite çalışmalarına kadar çeşitliliği kapsayan ve farklı disiplinleri barındıran, bütçesi özerk olan multidisipliner araştırma ve kalite kontrol merkezleri kurulması,

b) Safsızlıklar konusunda hizmet sunan mevcut kalite kontrol laboratuvarlarının altyapısının geliştirilmesi ve bu alanda görev alabilecek uzman (özellikle risk bazlı değerlendirme konusunda) personelin istihdamının artırılması,

c) Kamu-üniversite-özel sektör işbirliğinin artırılarak konuya ilişkin ülke araştırma kaynaklarının daha etkin ve verimli şekilde kullanılması, bu alanda öncelikli destek programlarının artırılması,

B. Veteriner Tıbbi Ürüne yansıyan safsızlıkların etkin madde tedarikçisi, üretim yeri, ürün bileşimi gibi parametrelere bağlı olarak çeşitliliğini en aza indirmek amacıyla;

a) Tıbbi ürünün piyasaya arzı öncesi ve sonrası süreçte safsızlık potansiyellerinin bağımsız araştırmacılar tarafından izlenmesi,

b) Farmakope gerekliliklerine uygun referans standart ve madde kullanımıyla gerçekleştirilen araştırmalar kapsamında, etkin maddelerin yanı sıra yardımcı madde safsızlıklarının da incelenmesi, safsızlıklara ilişkin potansiyel etkileşimlerin değerlendirilmesi ve ulaşılan verilerin bilimsel platformda yayımlanması,

c) Tıbbi ürünlerde saptanan safsızlıklarının hayvan türleri üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesinde, bilimsel geçerliliği olan yöntemlerin kullanılması (hedef hayvan türüyle ilişkili *in vitro* test sistemleri gibi),

d) Farklı sınıflandırmalara ait safsızlıkların, diğer safsızlıklarla birlikte tespit edilmesi olasılığına dayanarak (Örneğin elemental ve çözücü kalıntısı safsızlıkları) organizma yönünden kombine toksik etkisinin değerlendirilmesi için araştırmalar planlanması,

e) Genotoksik safsızlıklar konusunda kılavuzlar AMES testini referans test olarak göstermesine rağmen bu testin sonuçlarına ilişkin tartışmalı bilimsel görüşler bulunmakta ve safsızlık tespiti için gereken test materyali nedeniyle zorluklarla karşılaşmaktadır. Dolayısıyla alternatif test yöntemlerine yönelik araştırmaların artırılması,

f) Geçmişte yaşanan olumsuz tecrübeler gözönünde bulundurularak izomerlerin terapötik ve toksik etkilerine yönelik araştırmaların artırılması,

C. İlaç safsızlığı kaynaklı düşük farmasötik kalitedeki ürünlerin ulusal ve uluslararası pazarda haksız rekabet edebilme potansiyelinin önüne geçilebilmesi için üreticiler tarafından;

a) Safsızlıklar konusuna ilişkin İlaç Ajansları kılavuzları ile birlikte Avrupa Kimyasallar Ajansı düzenlemelerinin yakından takip edilmesi,

b) Başlangıç materyali ve tıbbi ürün üretim prosesinde bilinen üretim yöntemlerinde gerçekleştirilen küçük değişikliklerin dahi potansiyel safsızlıklar üzerinde etkisinin büyük çapta olabileceği unutulmamalıdır. Dolayısı ile hedef hayvan, halk ve çevre sağlığına yönelik etkiler dikkate alınarak üretim aşamasında safsızlık kontrollerinin sıklığının artırılması, proses değiştirildiğinde safsızlık profillerinin detaylı olarak karşılaştırması,

c) Barındırdığı safsızlıklarının güvenilirliği hakkında yeterli bilginin bulunmadığı, dolayısı ile hedef hayvan, kullanıcı, tüketici ve çevreye etkileri konusunda risk potansiyeline sahip kimyasal maddelerin takip edilmesi ve gerekli önlemlerin alınması,

d) Hedef hayvan, kullanıcı, tüketici ve çevre sağlığına yönelik olası etkileri dikkate alınarak fi-

zyolojik fonksiyonları olumsuz etkileme potansiyeli bulunan yardımcı maddelerden kaçınılması,

d) Farmakovijilans verileri, ürün yaşam döngüsünün önemli geri bildirimlerini sağlayabilecek sistem olup, istenmeyen etkilerin safsızlıklar nedeniyle de meydana gelebileceğinin dikkate alınması,

e) Uzun dönem, ara koşul, hızlandırılmış, in-use stabilite ve stres testleri sonucunda saptanan yardımcı maddelerdeki kayıpların, degradasyon ürünlerine etkisinin değerlendirilmesi,

f) DNA reaktif safsızlıklara ilişkin kılavuz esas alınarak, hedef hayvan ve kullanıcı güvenilirliği yönünden bu tip safsızlıklara ilişkin hükümlerin uygulanması,

g) Risk değerlendirme ilkelerinin, pazarlama izin sahiplerinin sorumluluğunda olduğunun göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

Biyolojik ve biyoteknolojik ürünler için ise konak hücre DNA'sı, hücre kültürü medyum bileşenleri, enzimler, ligandlar, izomerizasyon, asetilasyon, metilasyon, glikolizasyon gibi modifikasyonlar meydana gelebileceği için, safsızlık kontrollerinde ilişkili safsızlıkların artabileceğinin gözönünde bulundurulması önerilmektedir (Anonim 2011b).

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Doktora tezi, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü-TAGEM tarafından "*Veteriner Sağaltımda Yaygın Olarak Kullanılan İvermektin, Enrofloksasin ve Flunixin Meglumin Preparatlarının Safsızlıklarının Tayini ve Olası Genotoksik-Sitotoksik Potansiyellerinin In Vitro Olarak Araştırılması*" projesi kapsamında desteklenmiştir.

Bilgi: Bu derleme, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü bünyesinde yürütülen "*Türkiye'de ruhsatlı ivermektin çözeltilerinin safsızlık tayini ve olası genotoksik-sitotoksik etkilerinin in vitro olarak araştırılması*" isimli doktora tez çalışmasından türetilmiştir.

Kaynakça

Akı-Yalçın E, (2017). Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizinde Kullanılan Fizikokimyasal Parametreler (QSAR Parametreleri). Sunu. Ankara Üniversitesi. http://www.esisresearch.org/Uploads/Documents/qsar_parametreler_2017.pdf Erişim Tarihi; 03.05.2020.

American Chemical Society, (ACS), (2014). <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/t/thalidomide.html>. Erişim Tarihi: 04.12.2019

Anonim, (2009). European Commission, Regulation (EC) No 470/2009. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009R0470> Erişim Tarihi; 27.03.2020.

Anonim, (2011a). Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete, 24.12.2011-28152. Erişim Tarihi:20.01.2020.

Anonim, (2011b). https://admin.ich.org/sites/default/files/in-line-files/SESSION_III_ICHQ6B_Specifications.pdf. Erişim Tarihi:20.01.2020.

Anonim, (2012a). İmmünojik Veteriner Tıbbi Ürünler Dışındaki Veteriner Tıbbi Ürünlerin Başvuru Dosyası Kılavuzu. Erişim Tarihi: 20.01.2020, [https://kms.kay-sis.gov.tr/\(X\(1\)S\(13uw3bibpicsqth4um00cotp\)\)/Home/Goster/56460?AspxAutoDetectCookieSupport=1](https://kms.kay-sis.gov.tr/(X(1)S(13uw3bibpicsqth4um00cotp))/Home/Goster/56460?AspxAutoDetectCookieSupport=1).

Anonim, (2012b). Veteriner Tıbbi Ürünler İçin İyi Üretim Uygulamaları (GMP) Kılavuzu, https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Veteriner%20Hizmetleri/vetsagurun/VTU_icin_GMP_Klavuzu.pdf Erişim Tarihi:14.03.2020.

Anonim, (2015). European Commission. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Volume 6B Notice to applicants, Veterinary Medicinal Products, Presentation and Content of the Dossier.

Bakırel T, (2020). Hayvansal Gıdalarda İlaç Kalıntıları ve Veteriner Tıbbi Ürünlerin Ruhsatlandırılması. Atatürk Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, 198-225.

Devlet Planlama Teşkilatı (DPT), (2007). Dokuzuncu kalkınma planı (2007-2013): İlaç Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu.

Elder D P, Kuentz M, Holm R, (2016). Pharmaceutical excipients—quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 88-99. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.12.018

Erkeoğlu P, Baydar T, Şahin G, (2014). Toksikolojik Açıdan İlaç Safsızlıkları. *Türkiye Klinikleri J Pharm Sci* 2014;3(2). doi: 10.5336/pharmsci.2014-41382

European Medicines Agency (EMA), (1991). Guideline: Specifications and Control Tests on the Finished Product.

European Medicines Agency (EMA), (1993). Investigation of Chiral Active Substances.

European Medicines Agency, (EMA), (2007a). Opinion, https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/chmp-scientific-article-53-opinion-potential-risks-carcinogens-mutagens-substances-toxic_en.pdf Erişim Tarihi; 27.06.2019.

European Medicine Agency (EMA) (2007b). Recommendation On The Evaluation Of The Benefit-Risk Balance Of Veterinary Medicinal Products.

European Medicine Agency (EMA) (2007c). Guideline on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Medicinal Products. EMEA/CVMP/VICH/899/99-Rev.1.

European Medicine Agency (EMA) (2008). Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products. EMEA/CVMP/QWP/846/99-Rev.1.

European Medicines Agency (EMA), (2009). Recommendation on the assessment of the quality of medicinal products containing existing/known active substances.

European Medicines Agency (EMA), (2015). Guideline on the assessment of persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) or very persistent and very bioaccumulative (vPvB) substances in veterinary medicinal products.

European Medicines Agency (EMA), (2017). Implementation of risk assessment requirements to control elemental impurities in veterinary medicinal products. EMA/CVMP/QWP/631010/2017.

European Medicines Agency (EMA), (2018a). CVMP assessment report regarding the request for an opinion under Article 30(3) of Regulation (EC) No. 726/2004 For veterinary medicinal products containing gentamicin for parenteral administration to horses.

European Medicines Agency (EMA), (2018b). Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) im-

- purities in veterinary medicinal products. EMA/CVMP/SWP/377245/2016.
- Flamand N, Meunier JR, Meunier PA, Agapakis-Causse C, (2001). Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicology in vitro*, 15(2), 105-114.
- Food and Drug Administration (FDA), (2020). Inactive Ingredient Database. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> Erişim Tarihi; 08.03.2020.
- International Conference on Harmonisation (ICH), (1990). History. <https://www.ich.org/about/history.html>, Erişim Tarihi:11.11.2019.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (1993). <https://vichsec.org/>, Erişim Tarihi:11.11.2019.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2005). GL39 (Quality), Test procedures and acceptance criteria for new veterinary drug substances and new medicinal products: chemical substances.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2007a). VICH GL10 (Quality), Impurities In New Veterinary Drug Substances.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2007b). VICH GL11 (Quality), Impurities In New Veterinary Medicinal Products.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2011). VICH GL18 (Quality), Impurities: Residual Solvents In New Veterinary Medicinal Products, Active Substances And Excipients.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2014). VICH GL23 (Safety), Studies To Evaluate The Safety Of Residues Of Veterinary Drugs In Human Food: Genotoxicity Testing.
- Jacobson-Kram D, McGovern T, (2007). Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced drug delivery reviews*, 59(1), 38-42. DOI: 10.1016/j.addr.2006.10.007
- Liu KT, Chen CH, (2019). Determination of Impurities in Pharmaceuticals: Why and How?. In *Quality Management and Quality Control-New Trends and Developments*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.83849
- Mike F, Pehlivan SB, Öner L, (2014). Farmasötik Ürünlerde Tasarımla Kalite Yaklaşımı. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, (2), 203-230.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2015). *Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines*.
- Pilaniya K, Chandrawanshi HK, Pilaniya U, Manchandani P, Jain P, Singh B, (2010). Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. *J Adv Pharm Technol Res*, 2010 Jul-Sep; 1(3): 302-310. DOI: 10.4103/0110-5558.72422
- Pindelska E, Sokal A, Kolodziejewski W, (2017). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced drug delivery reviews*, 111-146. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014>
- Plošnik A, Vračko M, Sollner Dolenc M, (2016). Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 67(3), 169-182. DOI: 10.1515/aiht-2016-67-2801
- Rägo L, Santoso B, (2008). *Drug Regulation: History, Present and Future*, WHO, 65-76.
- Smith S, (2009). Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different, *Toxicological Sciences*, 110(1), 4-30. DOI: 10.1093/toxsci/kfp097
- Tian Y, Chang Y, Feng YC, Zhang DS, Hu C, (2015). Isolation, identification and characterization of related substances in furbenicillin. *The Journal of Antibiotics*, 68(2), 133-136. DOI: 10.1038/ja.2014.145
- Vargesson N, (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms, *Birth Defects Res C Embryo Today*, Jun; 105(2): 140-156. DOI: 10.1002/bdrc.21096
- Wu Y, Levons J, Narang AS, Raghavan K, Rao VM, (2011). Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1248-1263. DOI: 10.1208/s12249-011-9677-z
- Ziegelbauer HE, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ, (2009). "Applications of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity". *Toxicol Lett*. 2009, 186, 36-44. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.08.017

