



## Effect of stevioside on in vitro replication of bovine parainfluenza-3 virus

Çağla YILMAZ<sup>1,a</sup>, Semra GÜMÜŞOVA<sup>1,b,\*</sup>

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

\*Corresponding author

### Research Article

#### History

Received: 29/04/2024

Accepted: 10/06/2024

This study summarized from the author's master's thesis. This study was supported by Ondokuz Mayıs University with the project number PYO.VET.1904.21.033.

### ABSTRACT

In this study, the antiviral effect of stevioside contained in stevia, a popular plant of recent years, which has previously been shown to be antiviral on human viruses, on BPIV-3 was investigated for the first time. With the new data obtained, it was revealed whether stevioside could be an option in the fight against BPIV-3 infection, which causes significant losses in terms of the national economy and cannot be controlled by vaccination. For this purpose, the nontitotoxic dose of stevioside in MDBK cell culture was determined by cytotoxicity test and the antiviral effect of stevioside on BPIV-3 was determined by titration test in BPIV-3 titers treated and untreated with stevia. According to our results, it was determined that stevia showed an antiviral effect by decreasing the titer of BPIV-3 produced in MDBK cell culture from 10-3.7/0.1ml to 10-1/0.1ml and 100/0.1ml, respectively, when applied at 10µmol/L and 5000 µmol/L, which was measured as noncytotoxic dose.

**Keywords:** Antiviral effect, BPIV-3, Cytotoxicity, Stevioside

## Steviosidin sığır parainfluenza-3 virusun in vitro replikasyonuna etkisi

#### Süreç

Geliş: 29/04/2024

Kabul: 10/06/2024

Bu çalışma yazarın yüksek lisans tezinden elde edilmiştir. Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.033 numaralı proje ile desteklenmiştir.

### Öz

Bu çalışma ile daha önce insan virusları üzerinde antiviral etkinliği gösterilmiş olan son yılların popüler bitkisi stevianın içeriğindeki steviosidin BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi ilk kez araştırıldı. Ülke ekonomisi açısından önemli kayıplar oluşturan ve aşı ile istenilen kontrolün sağlanamadığı BPIV-3 enfeksiyonu ile mücadelede steviosidin bir seçenek olup olamayacağı elde edilen yeni verilerle ortaya koyuldu. Bu amaçla steviosidin MDBK hücre kültüründeki nonsitotoksik dozu sitotoksikite testi ile belirlendikten sonra BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi stevia ile muamele edilen ve edilmeyen BPIV-3 titreleri titrasyon testi ile belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, stevianın 10 µmol/L ve nonsitotoksik doz olarak ölçülen 5000 µmol/L oranlarında uygulandığında, MDBK hücre kültüründe üretilen BPIV-3'ün titresini 10-3.7/0.1 ml'ten sırasıyla 10-1/0.1 ml ve 100/0.1 ml'ye düşürerek antiviral etki gösterdiği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Antiviral Etki, BPIV-3, Sitotoksikite, Stevia

#### Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

<sup>a</sup> yilmazcagla94@hotmail.com

<sup>b</sup> 0000-0002-7646-9142

gumusova@omu.edu.tr

000-001-8574-521X

**How to Cite:** Yılmaz C, Gumusova S (2024) Effect of stevioside on in vitro replication of bovine parainfluenza-3 virus, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 12-16

### Giriş

Tıbbi bitki olarak kabul edilen *Stevia rebaudiana*, Asteraceae ailesine ait çok yıllık küçük bir çalıdır. Paraguay'ın kuzeydoğusundaki Amambay bölgesine özgü olmakla birlikte 2012 yılından beri Antalya, Adana, Rize, Burhaniye, Söke, Yalova, Hatay ve İzmir' de üretimi

yapılmaktadır. Son yıllarda adını sıklıkla duyduğumuz doğal tatlandırıcı bir bitki olan stevia yüksek oranda fenol, flavonoid ve antioksidan aktivite içerir (Taleie ve ark., 2012). Stevianın antibakteriyel, antiseptik, antihipertansif, antifungal, antienflamatuar ve antitümöral etkinliği olduğu

son yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Mathur ve ark., 2017; Momtazi-Borojeni ve ark., 2017; Ranjan ve ark., 2011; Verma ve ark., 2019). Yapılan bilimsel çalışmalarla, stevianın virus replikasyonunu önlediğini ve virus adsorpsiyonu, penetrasyonu ve hücreler arasındaki yayılımı engelleyerek antiviral aktivite gösterdiği de bildirilmiştir. (Ceole Ligia ve ark., 2018; Kedik ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2021; Takahashi ve ark., 2001).

Siğir parainfluenza virusu tip 3 (BPIV-3), siğir herpesvirus tip-1 (BHV-1), bovine respiratuar sinsityal virus (BRSV) ve bovine viral diyare virusu (BVDV) gibi patojenlerle birlikte siğirlerin solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) içerisinde yer alan önemli bir viral etkindir (Fulton ve ark., 2017). Son klasifikasyonda Bovine respirovirus olarak isimlendirilen bovine parainfluenza 3 virusu (BPIV-3), Paramyxoviridae ailesinin Orthoparamyxovirinae alt ailesinin Respirovirus cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Yapılan araştırmalar ile BPIV-3 enfeksiyonunun tüm dünyada ve ülkemizdeki varlığı birçok kez ortaya koyulmuş ve siğirlerde enfeksiyonunun varlığı ile ilgili ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan araştırmalarda ise %18-91.1 arasında değişen oranlarda seroprevalansın olduğu belirlenmiştir (Gay & Barnouin, 2019; Gümüşova ve ark., 2007; Gür, 2019; Leal ve ark., 2019; Yazıcı ve ark., 2019). Ülkemiz besi ve süt siğiri yetiştiriciliği için büyük bir öneme sahip olan BPIV-3, ülke ekonomisi üzerinde oluşturacağı potansiyel risk nedeniyle büyük bir tehdit unsurudur (Gumusova ve ark., 2007). Yapılan literatür taramalarında, stevianın BPIV-3 üzerindeki antiviral etkinliğini gösteren bir araştırmaya rastlanılmaması sebebiyle yaptığımız çalışmada, siğirlerde önemli solunum sistemi semptomları ve ekonomik kayıplara sebep olan BPIV-3 üzerinde steviosidin antiviral etkisi, ticari olarak saflaştırılmış stevia preparatı kullanılarak in vitro ortamda araştırılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Yapılan çalışma, in vitro deney ortamında gerçekleştirilmesi sebebiyle hayvan deneyleri yerel etik kurul (HADYEK) iznine tabii değildir.

### Hücre kültürü ve Virus İzolasyonu

BPIV-3' nin izolasyonu, titrasyonu ve steviada sitotoksikite testleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı ve Bovine parainfluenza virus 3 Genotip C (BPIV-3c) (MH357343) kullanıldı. MDBK hücre süspansiyonu hazırlamada ve virus inokulasyonunda kullanılacak MDBK hücrelerini üretmek için MDBK hücre stoklarının koyulduğu hücre kültürü flaskları (25 ve 75 cm<sup>2</sup>) içerisine hücrenin üretileceği flask hacminin %10'u oranında MEM hücre üretme vasatı (%10 fetal dana serumu ve %1 antibiyotik solüsyonu) ilave edildi ve hücreler 37°C'lik etüve koyularak her gün hücre kültürü mikroskopunda (Olympus, CKX41, Japonya) kontrol edildi. Flask tabanının yaklaşık %80' ini kaplayan hücrelere adsorpsiyonlu yöntemle DKID50 değeri 10-3.5/0.1ml olan BPIV-3 inokulasyonu yapıldı.

## Stevianın Non-sitotoksik Dozunun Hesaplanması

Stevia ekstraktı SigmaAldrich (Cat. No: 06295001-500MG, USA) firmasından temin edildi ve Stevianın MDBK hücrelerindeki sitotoksik etkisi, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda araştırıldı. Bu bağlamda 96 kuyucuklu mikroyuvalara mililitresinde 1×10<sup>6</sup> MDBK hücresi içeren hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından MEM vasatı içerisinde hazırlanan, stok stevianın farklı konsantrasyonundan (10, 20, 50, 100, 200 ve 5000 µmol/L) 50 µl, kontrol için hazırlanan kuyucuklara ise 50 µl hücre üretme vasatı ilave edilerek pleyletler 37°C' lik etüde 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda etüvden alınan kuyucukların içerisindeki stevia, pipet yardımı ile hücreye zarar vermeden alınıp, CCK-8 solüsyonundan 10 µl eklendi ve 37°C de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleyletler optik yoğunluğu (OD) 450 nanometre (nm) olan mikroyuvala okuyucuda (Tecan Infinite F50) okundu. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve stevianın non sitotoksik dozu "[((OD test-OD blank)/(OD kontrol-OD blank)]×100" formülüne göre hesaplandı.

### Mikrotitrasyon testi

Nonsitotoksik dozda stevia uygulanan ve uygulanmayan BPIV-3' ün doku kültürü enfektif dozunun (DKID50) hesaplanması için mikrotitrasyon testi yapıldı (Frey & Liess, 1971). Bu amaçla virusun log<sub>10</sub> tabanına göre hesaplanarak bir seri sulandırması yapıp her sulandırma için mikrotitrasyon pleyletinin 4 gözüne 100'er µl koyuldu. Aynı işlem non toksik konsantrasyonlarda (10 ve 5000 µmol/L) stevia ile 24 saat inkübe edilen BPIV-3 içinde tekrarlandı. Takiben sulandırmaların üzerine ml' sinde 300.000 (3×10<sup>5</sup>) canlı hücre bulunan hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Hücre kontrol olacak 4 göze 100 µl vasat ve 50 µl hücre süspansiyonu, virus kontrol olacak 4 göze ise 100 µl virus ve 50 µl hücre süspansiyonundan koyuldu. Mikrotitrasyon pleyleti 37°C'lik etüve kaldırıldı. Mikrotitrasyon pleyletleri mikroskop altında CPE oluşumları yönünden her gün gözlemlendi ve virus kontrolün 4 gözünde de CPE oluştuğunda test sonuçları değerlendirildi. Sonuçlar Spearman-Kärber metoduna göre hesaplandı (Thrusfield, 2005).

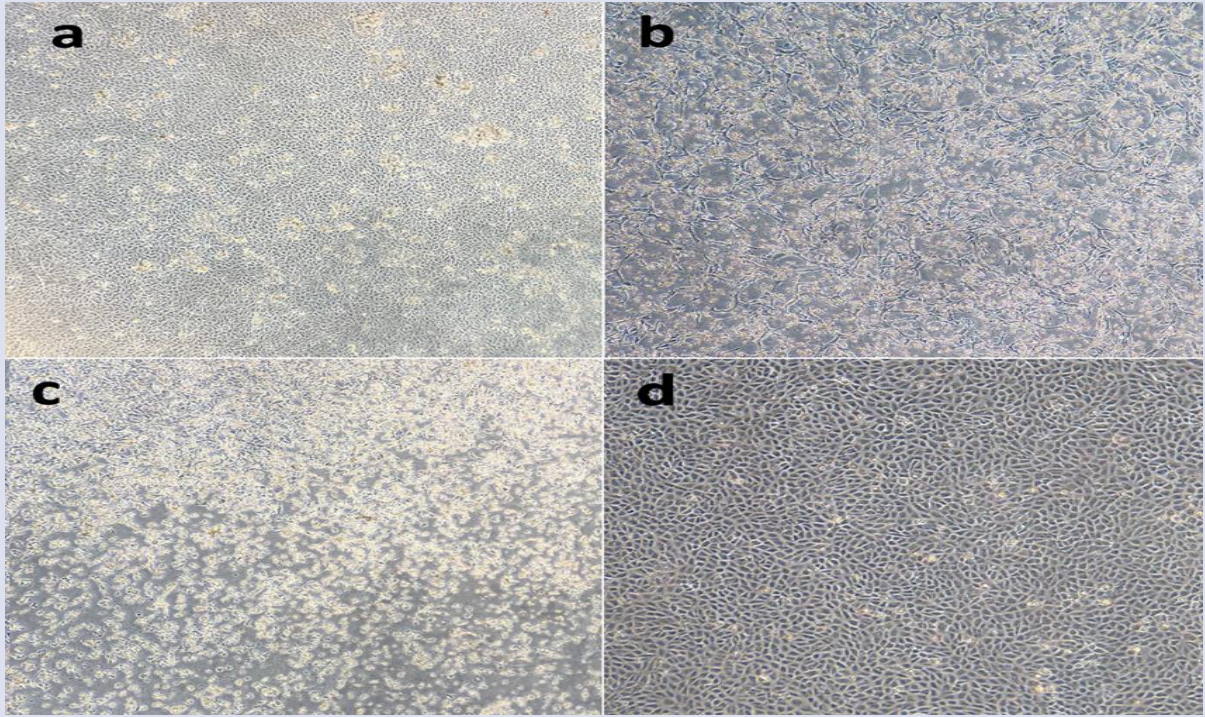
### İstatistiksel Analiz

Sitotoksikite denemelerinden (üç tekrar) elde edilen verilerin ortalaması alındı. Ayrıca kontroller ve stevianın farklı dozlarının uygulandığı BPIV-3' lerin viral yük farklılıkları ise titre olarak ifade edildi.

## Bulgular ve Tartışma

### BPIV-3 İnokulasyonu

MDBK hücrelerine adsorpsiyonlu yöntemle inokulasyonu yapılan BPIV-3, hücre kültürü mikroskopunda kontrol edildi ve 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri fotoğraflandı. Fotoğraflar Resim 1'de gösterildi.

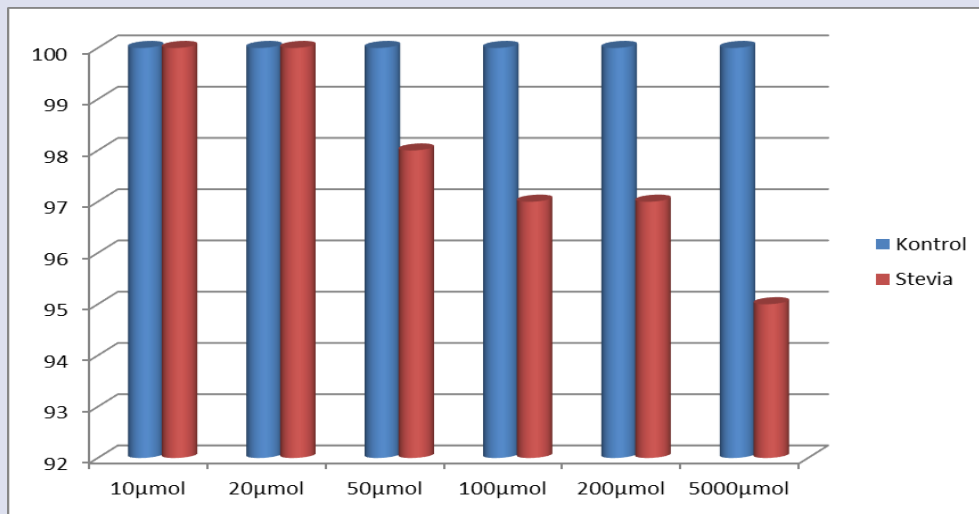


Resim 1. BPIV-3'ün MDBK hücre kültüründe (a) 24., (b) 48., (c) 72. saat görüntüsü ve MDBK hücre kontrol (d) (40X Büyütme)  
Figure 1. (a) 24th, (b) 48th, (c) 72nd hour image of BPIV-3 in MDBK cell culture and MDBK cell control (d) (40X Magnification)

#### Stevianın Sitotoksikite Testi Sonuçları

Stevianın MDBK hücrelerindeki (WST-8) canlılık testi Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak sitotoksik etkisi belirlendi. Bu amaçla BPIV-3'ün önce 10, 20, 50, 100, 200, 5000  $\mu\text{mol}$  konsantrasyonlardaki sitotoksitesini ölçüldü ve % 97 oranıyla yaklaşık hücre kontrol düzeyinde bir canlılıkla hücre için non sitotoksik olduğu saptandı. Maksimum doz için 5000  $\mu\text{mol}$  den başlayarak saf steviaya kadar farklı sulandırmalarla

yapılan canlılık testlerinde 5000  $\mu\text{mol}$  sulandırmada % 95 oranında canlılık saptanırken 5000  $\mu\text{mol}$ 'den sonraki sulandırmalarda stevianın yüksek konsantrasyonda hücre yüzeyine çökmesi dolayısıyla sitotoksitesini ölçülemedi ve bu nedenle maksimum ve minimum nonsitotoksik doz olan 10 ve 5000  $\mu\text{mol}$  sulandırma basamaklarındaki canlılıklar canlı hücre sayımı ile doğrulanarak antiviral etkinlik için nonsitotoksik doz olarak seçildi. Test sonucundaki hücre sağ kalım oranları Resim 2'de gösterildi.



Resim 2. Stevianın MDBK hücre kültüründe yapılan sitotoksikite testi sağ kalım oranları  
Figure 2. Survival rates of stevia cytotoxicity test performed in MDBK cell culture

### Mikrotitrasyon Testi Sonuçları

Farklı stevia konsantrasyonları ile muamele edilen ve edilmeyen BPIV -3'ün mikrotitrasyon testi sonunda, stevia uygulanmayan BPIV-3'ün enfeksiyözite gücü 10<sup>-3.7</sup> /0.1 ml olarak saptanırken farklı konsantrasyonlarda (10-5000 µmol/L) steviosid uygulanan BPIV-3'ün enfeksiyözite gücünün ise 10 µmol/L steviosid uygulanan BPIV-3'de 10<sup>-1</sup>/0.1 ml' ye düştüğü, 5000 µmol/L stevia uygulanan BPIV-3'de ise virus üremesinin tamamen ortadan kalkarak virusun inaktive olduğu belirlendi (Çizelge 1).

Çizelge 1. BPIV-3'ün MDBK hücre kültüründe stevia uygulanmadan ve farklı dozlarda stevia uygulaması sonrası enfeksiyözite gücü sonuçları

Table 1. Infectious potency results of BPIV-3 in MDBK cell culture without stevia application and after different doses of stevia application

UYGULAMALAR	DKID <sub>50</sub> DEĞERLERİ
BPIV-3	10 <sup>-3.7</sup> /0,1 ml
BPIV-3 + 10 µmol/L stevia	10 <sup>-1</sup> /0,1 ml
BPIV-3 + 5000 µmol/L stevia	10 <sup>0</sup> /0,1 ml

Stevia, insan sağlığı için birçok faydası kanıtlanmış olan, birincil ve ikincil metabolitler içeren bir bitkidir. Stevianın antihipertansif, antidiyabetik, antioksidan, antienflamatuar, antihiperlipidemik, antionkojenik, antimikrobiyal ve antiviral etkileri birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, stevianın sağlıklı ve kalorisiz olması nedeniyle şeker yerine tatlandırıcı olarak kullanılabilineceği, bitkinin doğal olması sebebiyle zararsız olduğu ve sentetik bileşikler gibi toksik etkiye sahip olmadığı için de birçok hastalığın tedavisi veya önlenmesi için potansiyel bir bitki olabileceği bildirilmiştir (Latarissa ve ark., 2020). Behl ve ark. (2021) yılında yayınladığı derlemede birçok fitokimyasalın viruslarla mücadele etme potansiyeli olduğunu bildirmiştir. Bugün, özellikle koronavirus pandemisi gibi son dramatik olayların ışığında, yeni antiviral ajanlara yönelik kritik bir ihtiyaç oluşmuş ve antiviral aktiviteye sahip yeni terapötik ürünlere olan talep artmıştır. Bu sebeple, yeni potansiyel antiviral ajanların keşfedilmesi ve geliştirilmesi için bitkilerin bu amaçla sistematik olarak araştırılması önemlidir. Stevianın antiviral etkinliğine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Stevia ile yapılan in vitro bir çalışmada, S. rebaudiana'nın yapraklarından elde edilen iki ham polisakkarit olan, 'crude fraction' (SFW) ve 'homojen alkali fraksiyon' (SSFK) nın, Herpes simpleksvirus-1'e (HSV-1) karşı antiviral etki gösterdiği ortaya koyulmuştur. Yapılan çalışmada polisakkarit SFW'nin %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC50) 275 g/ml'den ve SSFK'nin 1000 g/ml'den yüksek olduğu bulunmuştur. Ortalama %50 etkili konsantrasyon (EC50) değerleri sırasıyla SFW için 0.3 g/ml ve SSFK için 18.8 g/ml olarak tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, stevianın vero hücre kültürlerinde üretilen HSV-1'in

replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2013). Rotavirus üzerinde stevianın antiviral etkisine bakılan başka bir çalışmada ise stevia ve Sophora flavescens (SV) özlerinin domuzlarda rotavirus üzerinde antiviral etkiye sahip olduğu ve oral yolla verilen SV'nin stevianın bağırsak lümeninde emilimini artırarak rotavirus replikasyonunu inhibe edebildiği ve stevianın, rotavirusun hücresele reseptörlere bağlanmasını inhibe ettiğini in vitro olarak göstermiştir (Alfajaro ve ark., 2014). Stevia ile yapılan bir diğer çalışmada, 2000 µg/ml dozunda stevia ekstraktının domuzların viral ensefalomyelitisi virusunun üremesini 0.5 µg/ml, enfeksiyöz rinotraheitis (IRT) virusunu 0.25 µg/ml ve koronavirus 0.33 µg/ml DKID50' ye, 4000 µg/ml dozda stevia ekstraktının ise, domuzların viral ensefalomyelitisi virusunu 0.75 µg, IRT virusunu 0.5 µg ve koronavirusu 0.66 µg DKID50 ye düşürerek antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (Kedik ve ark., 2009). Sharma ve ark. (2021) tarafından zika virus üzerinde stevianın etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada pentagalloyl glikoz ve steviosid gibi doğal sakkaritlerin yüksek afiniteyle etkileşime girerek konakçı hücreye virus girişini inhibe ettiği ayrıca, Parishin A ve steviosid bileşiklerinin Zika virüsüne karşı potansiyel ilaç olarak kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Stevia rebaudiana bitkisinden elde edilen steviosid gibi birçok fitokimyasalın antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada MDBK hücrelerinde stevianın minimum ve maksimum non sitotoksik dozları olarak ölçülen 10 µmol/L ve 5000 µmol/L dozlarında kullanıldığında, MDBK hücre kültüründe üretilen BPIV-3'ün titresini 10<sup>-3,7</sup>/0.1 ml den sırasıyla 10<sup>-1</sup>/0.1 ml ve 100/0.1 ml' ye düşürerek antiviral etki gösterdiği ve. Kedik ve ark. (2009) ve Sharma ve ark. (2021) tarafından yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile benzer olduğu ortaya koyulmuştur. Yaptığımız çalışma ile BPIV-3 virusuna karşı da stevianın potansiyel ilaç olarak kullanılabilineceği ve ileri araştırmalar gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

### Sonuç

Bu çalışma ile BPIV-3 üzerinde antiviral ajan olduğu gösterilen stevianın MDBK hücrelerindeki ölçülebilen maksimum nontoksik dozunun 5000 µmol olduğu ve in vitro şartlarda BPIV-3'ün üremesini durdurarak antiviral etki gösterdiği belirlendi. Bu verilerden yola çıkarak, BPIV-3'ün neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde stevianın bir seçenek olarak değerlendirilebileceği, ancak bu konuda hayvan deneylerinin yer aldığı kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ülke ekonomisi için önemli yeri olan ve sığır yetiştiriciliği için ekonomik önem taşıyan diğer viral hastalıklar için de benzer çalışmaların yapılması önerilmektedir.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

## Kaynakça

- Alfajaro M, Rho C, Kim J, Park Jun-G, Kim Deok-S, Hosmillo M, et al. (2014). Anti- rotavirus effects by combination therapy of stevioside and Sophora flavescens extract. *Research in Veterinary Science*, 96 (3), 567- 575.
- Behl T, Rocchetti G, Chadha S, Zengin G, Bungau S Kumar A et al.(2021). Phytochemicals from Plant Foods as Potential Source of Antiviral Agents: An Overview, *Pharmaceuticals*, 14 (4), 381. Ceole Ligia F, Companhoni P, Lopes S, Oliveira B, Gonçalves C, Filho D, (2018). Anti-herpes activity of polysaccharide fractions from Stevia rebaudiana leaves. *Natural Product Research*, 34 (11), 1558-1562.
- Frey HR, Liess B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 18 (1), 61-71.
- Fulton RW, Neill, JD, Saliki JT, Landis C, Burge LJ, Payton ME, (2017). Genomic and antigenic characterization of bovine parainfluenza-3 viruses in the United States including modified live virus vaccine (MLV) strains and field strains from cattle. *Virus Research*, 235, 77–81.
- Gay E, Barnouin J, (2009). A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France. *Preventive Veterinary Medicine*, 89, 265-271.
- Gümüşova S, Yazıcı Z, Albayrak H, Cakiroglu D (2007). Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases. *Acta Veterinaria*, 57, 11-16.
- Gür S. (2019). Sığır, Koyun ve Keçilerin Bovine Parainfluenza 3 Virus Enfeksiyonuna Duyarlılıklarının Saha Şartlarında Serolojik Olarak Karşılaştırılması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 30, 7- 13.
- Kedik SA., Yartsev EI, Stanishevskaya IE. (2009). Antiviral activity of dried extract of Stevia. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43, 198 -199.
- Latarissa IR, Barliana, MI, Lestari K, (2020). A Comprehensive Review of Stevia rebaudiana Bertoni effects on Human Health and Its Mechanism. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 10 (2), 91-95.
- Leal E, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanov F, Liang L, Li J, Li S (2019). Cuilsolation of a Divergent Strain of Bovine Para influenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses*, 11 (6), 489.
- Mathur S, Neha BPS, Singh, Shekhawat G (2017). Critical Review on Steviol Glycosides: Pharmacological, Toxicological and Therapeutic Aspects of High Potency Zero Caloric Sweetener *International Journal of Pharmacology*, 13, 7, 916- 928.
- Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili SA, Abdollahi E, Sahebkar A (2017). A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from Stevia rebaudiana. *Current Pharmaceutical Design*, 23 (11), 1616-1622.
- Oliveiraa B, Cordeirob MC, Alvesa G, Coelec F, Tania U, Iacomini M (2013). Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1!6)-b-D-galactan core from Steviarebaudiana leaves. *Carbohydrate Polymers*, 94 (1), 179–184
- Ranjan R, Jaiswal J, Jena, J (2011). Stevia as a natural sweetener. *International Journal of Pharmacology*, 1 (4), 1199-1202.
- Sharma, N, Kumar P, Giri R (2021). Polysaccharides like pentagalloylglucose, parishin a and stevioside inhibits the viral entry by binding the Zika virus envelope protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (16): 6008-6020.
- Takahashi K, Matsuda M, Ohashi H, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S (2001). Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. *Antiviral Research*, 49: 15 -24.
- Taleie N, Hamidoghli Y, Rabiei B, Hamidoghli S (2012). Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of Stevia rebaudiana Bertoni *The International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4 (6): 298-302.
- Thrusfield M (2005). *Veterinary epidemiology*. 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford, 117-198.
- Verma MK, Kumar N, Rishikant A (2019). Review on the pharmacological properties and medicinal use of Stevia rebaudiana. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 8 (1), 371- 374.
- Yazıcı Z, Gumusova S, Tamer C, Muftuoglu B, Ozan E, Arslan S, Bas O (2017). The first serological report for genotype C bovine parainfluenza 3 virus in ruminant species of mid-northern Turkey: traces from the past. *Tropical Biomedicine*, 36(3), 803–80